

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
(Direktor: Prof. Dr. A. Seekamp)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität Kiel

UNTERSUCHUNG ZUR CHONDROGENEN POTENZ VON PLATELET-RICH PLASMA VERSUS HÄMARTHROS

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der
Christian-Albrechts-Universität Kiel

vorgelegt von
PASCAL SIMON PLÜMACHER
aus Flensburg

Kiel 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Deike Varoga MVZ Orthopädie und Chirurgie
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Both Klinik für Radiologie und Neuroradiologie
Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2017
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 23.03.2017
gez. PD Dr. Daniel Drücke,
Vorsitzender der Prüfungskommission

Inhalt

1. Einleitung	3
1.1. Epidemiologie	3
1.2. Der Gelenkknorpel	3
1.3. Osteoarthritis	5
1.4. Therapie der Osteoarthritis	6
1.4.1 Konservative Therapie	6
1.4.2 Operative Therapie	7
1.5. Hämarthros	8
1.6. Platelet-rich plasma (PRP)	8
1.7. Die Bedeutung der Wachstumsfaktoren und Zytokine im osteoarthrotischen Gelenk	13
1.7.1 Interleukin 1	13
1.7.2 Tumornekrosefaktor- α	14
1.7.3 Interleukin-6	15
1.7.4 Vascular endothelial growth factor	16
1.7.5 Transforming growth factor- β	17
1.7.6 Bone morphogenic protein 4	18
1.8. Das Ziel der Studie	19
2. Material und Methoden	20
2.1. Patienten nach Abrasionsarthroplastik	20
2.2. Gewinnung und Verarbeitung von Hämarthros	20
2.3. Probanden zur PRP-Gewinnung	20
2.4. Herstellung von platelet-rich plasma	21
2.5. Quantitative Bestimmung der Zytokine und Wachstumsfaktoren	21
2.5.1 ELISA	21
2.5.2 LUMINEX	23
3. Ergebnisse	24
3.1. Interleukin-1	24
3.2. Tumornekrosefaktor- α	25
3.3. Interleukin-6	26
3.4. Vascular endothelial growth factor	27
3.5. Transforming growth factor- β	28
3.6. Bone morphogenic protein 4	29

4. Diskussion	30
5. Zusammenfassung.....	38
6. Literaturverzeichnis	39
7. Anhang	55
7.1. Abkürzungsverzeichnis.....	55
7.2. Verwendete Materialien und Reagenzien.....	57
8. Danksagung	58
9. Lebenslauf.....	59
10. Veröffentlichungen	60

1. Einleitung

Durch Osteoarthritis entstandene Gelenkknorpelschäden beim Menschen sind bisher nicht im Sinne einer Wiederherstellung intakten hyalinen Knorpels heilbar. Die Rolle verschiedener Wachstumsfaktoren bei der Chondrogenese und Entstehung von hyalinem Knorpel ist vielfach beschrieben. Auch in Hämarthros konnten hohe Konzentrationen dieser Wachstumsfaktoren in vorangegangenen Studien gemessen werden (Hartz, 2012). In dieser Arbeit soll analysiert werden, in welchem Verhältnis knorpelanabole und knorpelkatabole Wachstumsfaktoren im Hämarthros nach Abrasionsarthroplastik bei Gonarthrose und im platelet-rich plasma (PRP) vorliegen.

1.1. Epidemiologie

Arthritis ist weltweit die häufigste Gelenkerkrankung (Paul, 2004) und hat in Deutschland eine Gesamt-Lebenszeitprävalenz von 22,7% in allen Altersgruppen und von 52,9% in der Altersgruppe ab 65 Jahren (Lange, 2012). In einer epidemiologischen Studie in Olmsted County, Minnesota stellten sich Osteoarthritis und Gelenkbeschwerden mit einer Prävalenz von 33,58% als zweithäufigste nichtakute Erkrankung dar (St. Sauver et al., 2013).

Besonders im Rahmen des steigenden Altersdurchschnittes westlicher Industrienationen kommt der Osteoarthritis eine zunehmende Bedeutung zu. Liegt die Lebenszeitprävalenz zwischen 30 und 44 Jahren noch bei 8,9% (Frauen) bzw. 8,7% (Männer), so beträgt sie bei den über 65-jährigen bereits 52,9% bzw. 34,8%. Bei der Geschlechterverteilung wird eine signifikant höhere Lebenszeitprävalenz deutlich: 27,1% der Frauen gegenüber 17,9% der Männer (Lange, 2012). Die wirtschaftliche Bedeutung der Osteoarthritis zeigt sich an den Kosten für das Gesundheitssystem von 7,62 Mrd. Euro (2008), was knapp 3% der gesamten Krankheitskosten in der Bundesrepublik Deutschland ausmacht (Nöthen, 2009).

1.2. Der Gelenkknorpel

Der Gelenkknorpel ist Knorpel vom hyalinen Typ. Seine Entwicklung beginnt mit der Zusammenlagerung mesenchymaler Zellen und Differenzierung zu Osteoblasten, die mit Aufnahme der Knorpelmatrixproduktion zu Chondrozyten werden. Die Knorpelmasse wächst durch interstitielles Wachstum, bei dem die Chondrozyten durch die zunehmende Extrazellulärmatrix auseinandergedrängt werden und schließlich in isogenen Gruppen postmitotischer Chondrozyten verbleiben. Es findet also nach Abschluss des interstitiellen Wachstums im gesunden Knorpel keine Zellteilung mehr statt. Der Gelenkknorpel besitzt kein Perichondrium aus Fibroblasten und undifferenzierten mesenchymalen Zellen.

Da der Gelenkknorpel gefäßlos ist, findet die nutritive Versorgung der Knorpelzellen hauptsächlich aus der Gelenkflüssigkeit über Konvektion statt. Die Knorpelmatrix, für deren Homöostase die Chondrozyten zuständig sind, besteht im Wesentlichen aus der funktionell bedeutsamen Kombination aus Kollagenfibrillen, Proteoglykanen und Wasser. Bei den Kollagenfibrillen handelt es sich vor allem um solche vom Typ II ergänzt durch Typ IX und XI. Im Gelenkknorpel haben sie einen Durchmesser von 50-100 nm und lagern sich nicht zu Fasern zusammen. Aufgrund der arkadenartigen Anordnung der Fibrillen kann die Spannung gleichmäßig über die kraftübertragenden Gelenkflächen verteilt werden.

Die Fibrillenarchitektur führt mikroskopisch zu einer zonalen Gliederung des Knorpels. In der Tangentialzone (I) an der Knorpeloberfläche verlaufen die Fibrillen tangential zur Oberfläche, um so der Zugspannung entgegenzuwirken. Es schließt sich eine Übergangzone (II) an, die in die Radiärzone (III) übergeht, in welcher die Fibrillen senkrecht zur Oberfläche angeordnet sind. In der Zone des mineralisierten Knorpels (IV) sind die Fibrillen verankert und die mit Hydroxylapatit durchsetzte Knorpelmatrix ist eng mit der subchondralen Knochenmatrix verzahnt. Um neben der tangentialen Zugfähigkeit auch die Druckfestigkeit und Druckelastizität des Gelenkknorpels zu gewährleisten, besteht die Extrazellulärmatrix außerdem aus Proteoglykanen (PG). Im Knorpel kommt vor allem das Proteoglykan Aggrecan vor.

Es besteht aus circa 100 Chondroitinsulfat-Ketten (Glykosaminoglykane) und circa 30 Keratansulfat-Ketten. Durch Interaktion von circa 100 Aggrecanmonomeren mit Hyaluronan (ein Glykosaminoglykan (GAG) aus 250-50000 Disaccharid-Einheiten) entstehen große PG-Aggregate, die mit den Kollagenfibrillen vernetzt sind. Durch den anionischen Charakter der GAG sammeln sich in intra- und intermolekularen Lücken Kationen, die aufgrund des osmotischen Gradienten für eine Wassereinlagerung sorgen. Aufgrund dieser Eigenschaften haben die PG das Bestreben sich auszudehnen. Durch die Vernetzung mit den zugfesten Kollagenfibrillen werden sie jedoch auf circa 20% ihrer eigentlichen Ausdehnung beschränkt und sind so permanent komprimiert.

So ergibt sich aus dem Expansionsdruck der PG und der Zugbelastung der Kollagenfibrillen die Druckfestigkeit und -elastizität, die es dem Knorpel erlaubt, Belastungen abzufedern. Bei Dekompression steigt durch Wiedereinstrom von Wasser der Expansionsdruck wieder. Diese stetige Dekompression und Kompression fördert auch die Konvektion zur nutritiven Versorgung der Chondrozyten. Die Belastbarkeit des Gelenkknorpels wird also durch die PG/GAG-Zusammensetzung und die Fibrillenarchitektur bestimmt. Im gesunden Knorpel findet ein ausgewogener Matrixumsatz durch die Chondrozyten statt, die über Matrix-Metalloproteasen (MMP) den Abbau katalysieren, der wiederum durch Inhibitoren wie die tissue inhibitors of metalloproteases (TIMP) moduliert wird. Bei Verlust dieses Umbau-Gleichgewichtes kommt

es zu degenerativen Veränderungen (Lüllmann-Rauch, 2003; Goldring, 2012).

1.3. Osteoarthritis

Die Osteoarthritis ist eine langsam fortschreitende degenerative Gelenkerkrankung des gesamten Gelenkes, die immer eine Veränderung des Gelenkknorpels beinhaltet. Die pathologischen Veränderungen umfassen die Gelenkknorpeldegeneration, subchondrale Sklerose, Osteophytenbildung, Synovialitis, Schädigung des Bandapparates und – im Falle des Kniegelenkes – der Menisken. Am Gelenkknorpel sind die ersten Veränderungen am Ort der größten Scherkräfte bzw. der größten mechanischen Belastung zu finden, der je nach Gelenk und individueller Skelettarchitektur variiert (Goldring, 2012).

Die Entstehung wird sowohl durch altersbedingte Knorpelveränderungen, aber auch durch unphysiologische mechanische Belastung, traumaassoziierte Entzündungsreaktionen, Übergewicht und genetische Prädisposition begünstigt. Der Ausgangspunkt der pathologischen Veränderungen im Gelenk sowie dessen Zeitpunkt ist bei dem engen funktionellen Zusammenhang von Gelenkknorpel, Synovialis und subchondralem Knochen noch nicht abschließend geklärt (Felson et al., 2000; Blagojevic et al., 2010). Derzeit stehen vor allem die Chondrozyten im Fokus der ursächlichen pathologischen Veränderungen. Histologisch findet bei der Osteoarthritis eine Aktivierung der inaktiven, ausdifferenzierten Chondrozyten statt, die zu Proliferation, Cluster-Bildung und gesteigerter Produktion von Matrixkomponenten und Knorpelmatrix-katabolen Enzymen führt. Diese Veränderungen werden unter dem Begriff der phänotypischen Plastizität zusammengefasst. Die aktivierten Chondrozyten sind jedoch nicht in der Lage, Gelenkknorpel mit den qualitativen Eigenschaften des nativen Knorpels herzustellen. Die Hauptangriffspunkte der Knorpeldegeneration sind Kollagen Typ II als Substrat der MMP-13 und Aggrecan, das von den Aggrecanasen der ADAMTS-Familie (a disintegrin and metalloproteinase with thrombosponin motifs) – vor allem 4 und 5 – abgebaut wird. Dabei wird das Kollagengerüst zunächst durch seine Proteoglykane vor Proteasen geschützt. Sobald die Proteoglykane von MMP-1 und MMP-13 abgebaut werden, bedeutet dies einen irreversiblen Knorpeldefekt (Goldring and Marcu, 2012).

Die Osteoarthritis als Erkrankung des ganzen Gelenkes beinhaltet auch eine synoviale Begleitentzündung, die in über 90% der Osteoarthritispatienten gezeigt werden konnte. Die Entzündung war dabei sowohl mit dem erhöhten Risiko für zunehmenden Knorpelabbau als auch den klinischen Symptomen wie Schmerz assoziiert (Roemer et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Einwanderung von mononukleären Zellen in die Synovialmembran mit konsekutiver Produktion von proinflammatorischen Mediatoren wie IL-1 β , TNF- α und Chemokinen sowohl für Früh- als auch Spätstadien der Osteoarthritis typisch ist (Sellam

and Berenbaum, 2010). Mechanische Fehlbelastungen des Gelenkknorpels, oxidativer Stress, proinflammatorische Zytokine und Knorpelmatrixdefekte induzieren katabole und inflammatorische Reaktionen über intrazelluläre Signalkaskaden (Goldring, 2012).

1.4. Therapie der Osteoarthritis

1.4.1. Konservative Therapie

Es gibt keine kurative konservative Therapie der Osteoarthritis und keine konservative Therapieoption kann den Fortschritt der Erkrankung zuverlässig verzögern. Die Ziele der symptomatischen Therapie bestehen in Schmerzlinderung, Verbesserung der Mobilität und Lebensqualitätverbesserung. Die derzeitigen Leitlinien schließen dazu eine medikamentöse Therapie sowie physiotherapeutische Massnahmen ein (Crawford et al., 2013).

Die Wirksamkeit der medikamentösen Therapie ist teilweise unzureichend nachgewiesen und wird wegen des Nebenwirkungsspektrums in der Langzeittherapie kontrovers diskutiert (Snijders et al., 2011). Die Leitlinien empfehlen Acetaminophen, topische und orale nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), Tramadol, sowie intraartikuläre Injektionen von Glukokortikoiden oder Hyaluronan-, Glukosaminoglykan- beziehungsweise Chondroitin-Sulfat (Stanos, 2013). Die oralen NSAID sind aufgrund ihres ausgeprägten gastrointestinalen und kardiovaskulären Risikoprofiles in der Langzeitbehandlung umstritten und die tatsächliche Beschwerdelinderung in verschiedenen Studien widersprüchlich (Altman, 2010; Barkin et al., 2010). Die lokale Applikation von Diclophenac und Lidocain in Form von intraartikulären Injektionen konnte in einigen Studien signifikante Schmerzreduktion bewirken (Gammaitoni et al., 2004; Baer et al., 2005). Die Anwendung von Capsaicin konnte in der Behandlung von leichter bis mittelschwerer Arthrose eine gewisse Schmerzreduktion bewirken, zeigte aber in der Hälfte der Fälle lokale Nebenwirkungen, die bei den meisten Patienten zum Behandlungsabbruch führten (Kosuwon et al., 2010). Glukokortikoid-Injektionen konnten in einer Metaanalyse nach 2 Wochen eine signifikante Überlegenheit der Beschwerdelinderung gegenüber dem Placebo zeigen, diese Überlegenheit bestand jedoch nach 4 Wochen nicht mehr (Reid et al., 2012). Entsprechend den Empfehlungen des American College of Rheumatology sollte der Einsatz auf vier Injektionen pro Jahr beschränkt werden. Hyaluronan und andere „visco-supplements“ konnten in mehreren Studien eine signifikante Besserung der funktionellen und Schmerzsituation mit einem Wirkmaximum zwischen 5 und 13 Wochen post injectionem (Reid et al., 2012) zeigen.

Aktuelle Leitlinien weisen auf die Möglichkeit der günstigen Beeinflussung des Krankheitsverlaufes durch Muskelstärkung, Korrektur von Fehlbelastungen durch Einlagenanpassung, Hydrotherapie, Balneotherapie, Elektrotherapie, Ultraschalltherapie sowie

pulsierende Magnetfeldtherapie hin (von Salis-Soglio, G., 2009).

1.4.2 Operative Therapie

Die gelenkerhaltende arthroskopische Chirurgie besteht in der Beseitigung mechanischer und inflammatorischer Reize. Dabei werden durch Lavage die proinflammatorischen Faktoren aus dem Gelenk gespült und durch Debridement von Defektarealen mechanische Reize, die zur weiteren Degeneration des Gelenkes führen, beseitigt. Letzteres wird verbunden mit dem Versuch der Oberflächenglättung des Knorpels zur Wiederherstellung korrespondierender Gelenkflächen durch Shaving oder Chondroplastik. Trotz vorübergehender symptomatisch-funktioneller Verbesserung kann so keine Wiederauffüllung des Knorpeldefektes erreicht werden (Evans et al., 1984; Bert and Maschka, 1989; Kim et al., 1991).

Knorpelstimulierende Verfahren werden angewandt, um eine Auffüllung des Knorpeldefektes zu erreichen. Das Ziel dieser Verfahren ist die Produktion von belastungsfähigem Knorpelregenerat durch Eröffnung des subchondralen Knochens und Markraums (Johnson, 2001). Über den Anschluss an die intraossee Vaskularisation kommt es zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Einwanderung von Stammzellen, die sich im Defektbett zu einem fibrinhaltigen „super-clot“ venetzen. Aus diesem entsteht im Rahmen der Wundheilung eine belastbare fibrocartilaginäre Defektfüllung (Mitchell and Shepard, 1976). Bei der Technik der Abrasionsarthroplastik (AAP) wird die gesamte subchondrale Schicht des Gelenkdefektes abhängig von der Sklerosetiefe arthroskopisch mit einer Fräse entfernt beziehungsweise bei der Mikrofrakturierung punktuell mit einer Ahle durchstoßen (Johnson, 1986) und so eine Integration des faserknorpeligen Regeneratgewebes in den umgebenden hyalinen Knorpel erreicht. Da bisher mit knorpelstimulierenden Verfahren kein Wiederaufbau hyalinen Knorpels und trotz struktureller Verbesserung der Gelenkflächen klinisch häufig keine Beschwerdefreiheit erreicht werden kann, wird das Verfahren kontrovers diskutiert (Friedman et al., 1984; Sherman et al., 1986). Die Nachsorge der Abrasionsarthroplastik erfordert die zweimonatige Schonung des Gelenkes, die sowohl ausgeprägte Compliance als auch die Nutzung von Gehstützen erfordert, was gerade bei älteren Patienten mit fortgeschrittener Osteoarthritis ein limitierender Faktor sein kann.

1.5. Hämarthros

Das Hämarthros ist der Gelenkerguss, der sowohl durch traumatische als auch operative Störung der Integrität durchbluteter Gelenkstrukturen – wie der Abrasionsarthroplastik – entsteht. Neben seiner essentiellen Funktion im Rahmen des posttraumatischen Wundverschlusses und Einleitung der Heilungsphase führt das Hämarthros auch zu negativen Effekten auf das intraartikuläre Entzündungsgeschehen. Dabei spielen nicht nur die Leukozyten und ihre kontrovers diskutierte katabole Wirkung im Rahmen der Defektheilung, sondern auch die Erythrozyten eine Rolle (Mishra and Pavelko, 2006a; Halpern et al., 2012). Durch Eisen-katalysierte Sauerstoffradikale kommt es zur Makrophagenaktivierung und gesteigerte Produktion von MMP-2 und MMP-9 durch die Synovialozyten (Sindrilaru et al., 2011; Boswell et al., 2012). Außerdem produzieren die in das Gelenk einwandernden neutrophilen Granulozyten IL-1 β und TNF- α , was zu einer gesteigerten Produktion der MMPs, ADAMTS und Elastasen durch Synovialozyten und Chondrozyten führt und so eine knorpelkatabole Wirkung begünstigt (Song et al., 2007; Smyth et al., 2012).

1.6. Platelet-rich plasma (PRP)

Bei PRP handelt es sich um die Plasmafraktion venösen Blutes mit isolierten und konzentrierten Thrombozyten. Thrombozyten sind 1-3 μ m große diskoidale Zellen, die von Megakaryozyten abgeschnürt werden. Neben anderen Zellorganellen enthalten sie α -, δ - und λ -Granula.

Die α -Granula, die für die Produktion der in dieser Arbeit gemessenen Wachstumsfaktoren zuständig sind, sind 50-80 nm groß, wandständig und werden bereits während der Reifung der Megakaryozyten gebildet. Pro Thrombozyt kommen 50-80 α -Granula vor, deren Inhalt nach aktuellem Kenntnisstand aus mehr als 30 bioaktiven Stoffen besteht.

Die Lebenszeit eines Thrombozyten beträgt ungefähr 5-9 Tage. Bei Gewebeverletzungen kommt es zunächst zur Thrombusbildung aus Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten in einem Fibrinnetz.

Der Wundheilungsprozess ist generell in 3 Phasen aufgeteilt. In der akuten inflammatorischen Phase findet die Thrombusformation, Degranulation der α -Granula, Aktivierung der Gerinnungskaskade und Einwanderung von Makrophagen und Granulozyten statt. Es schließt sich die Proliferationsphase mesenchymaler Zellen sowie deren Differenzierung an. Schließlich findet die Regenerationsphase statt, bei der der Defekt durch gewebsspezifische Zellen ersetzt wird. Die Thrombozyten spielen die Hauptrolle in der inflammatorischen Phase, behalten jedoch durch Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen auch eine essentielle Rolle für die Proliferation und Differenzierung von Zellen des Regeneratgewebes (Goldring, 2012;

Nurden, 2011). Nach Aktivierung der Thrombozyten in der inflammatorischen Phase kommt es zur Degranulation der α -Granula und Ausschüttung ihrer Inhaltsstoffe, wobei sie während der ersten 10 Minuten circa 70% ihrer Zytokine und Wachstumsfaktoren und innerhalb einer Stunde fast 100% ausschütten. Abhängig vom Alter werden durchlaufen manche Thrombozyten den Prozess der Apoptose und andere produzieren entsprechend ihrer Lebensdauer die ausgeschütteten Wachstumsfaktoren nach.

Bei der Degranulation werden unter anderem PDGF, TGF- β , IGF und VEGF ausgeschüttet. Auch Substanzen wie die Gewebshormone und Neurotransmitter Histamin und Serotonin (Marx, 2001) und Zelladhäsionsmoleküle wie Fibrin, Fibronectin, Vitronectin und Thrombosponin, die wichtig für die Migration von Osteoblasten, Fibroblasten und Epithelzellen sind, werden sezerniert (Marx et al., 1998a).

In der Folge der Thrombozytenaktivierung durch Calcium, Thrombin oder Gewebsthromboplastin bildet sich durch Polymerisation von Plasmafibrinogen ein Fibrinnetz. In dieser Fibrinmatrix sind die Thrombozyten eingebaut, so dass sie ortsständig gebunden sind und eine verlängerte Ausschüttung von Wachstumsfaktoren ermöglicht wird. Die Fibrinmatrix bildet gleichzeitig ein Gerüst für einwandernde Stammzellen und Fibroblasten sowie für Entzündungsmediatoren und Adhäsionsglykoproteine (Werner and Grose, 2003; Foster et al., 2009).

Zuerst fand PRP klinische Anwendung bei Operationen am offenen Herzen (1987), dann bei Mandibularekonstruktionen 1998 (Marx et al., 1998b). Heute ist die Verwendung in Sportmedizin, Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Zahnmedizin, Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Neurochirurgie, Ophthalmologie, Urologie, Herzchirurgie und der Behandlung von Wundheilungsstörungen verbreitet. Die normale Thrombozytenzahl im Blut liegt zwischen 150000 und 400000/ μ l. Es besteht noch keine einheitliche oder verbindliche Definition des PRP. Darüber hinaus besteht Uneinigkeit über eine kritische Konzentration von Thrombozyten im PRP, ab der eine klinisch relevante Wirkung auf Geweberegeneration oder deren Beschleunigung zu erwarten wäre. In der Literatur werden Werte vom 3-5fachen der Normalkonzentration oder mindestens 1000000/ μ l vorgeschlagen, die Spannbreite reicht jedoch vom 2-8,5fachen (Gandhi et al., 2006; Pietrzak and Eppley, 2005). Zwischen Konzentration und Wachstumsfaktorausschüttung besteht scheinbar keine lineare Beziehung, da in vitro-Untersuchungen ab 5facher Thrombozytennormalkonzentration keine weitere Verbesserung des Heilungsprozesses eintrat (Foster et al., 2009). Negative Effekte einer zu hohen Konzentration von Thrombozyten und deren bioaktiven Substanzen im PRP konnten für Wachstumsfaktoren wie VEGF und platelet-derived growth factor (PDGF) gezeigt werden. In Studien wurde eine dosisabhängige Verstärkung von Gewebeabbau, Degeneration (Ludin et al., 2013) oder die Produktion unerwünschten

Gewebes wie Osteophyten sowie fibrotischer Synovialhypertrophie (TGF- β , BMP) im Tiermodell gezeigt (Lories et al., 2005; van Beuningen et al., 1998; Li et al., 2000; Scharstuhl et al., 2003; Ranly et al., 2005). In klinischen Studien am Menschen wurden jedoch bisher keine destruktiven oder befundverschlechternden Nebenwirkungen unter PRP-Behandlung beschrieben (Kon et al., 2013).

Die Herstellungsverfahren von PRP sind ebenso uneinheitlich wie die Definition. So unterscheiden sich die handelsüblichen Herstellungssysteme stark in ihrer Konzentration von Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten.

Leukozyten-angereichertes PRP kann eine antibakterielle Wirkung entfalten, aber auch zu erhöhten proinflammatorischen Zytokinkonzentrationen führen (Visser et al., 2010). Die Leukozyten im PRP können MMP-3 und MMP-13 exprimieren und den Abbau von chondraler Extrazellulärmatrix bedingen (Mishra and Pavelko, 2006b). Es besteht eine negative Korrelation zwischen Leukozytenkonzentration im PRP und Indikatoren der Matrixsynthese wie cartilage oligomeric matrix protein und Decorin (McCarrel und Fortier, 2009). Der Anteil an verbliebenen Erythrozyten im PRP hat den bereits für das Hämarthros erwähnten Nachteil der Makrophagenaktivierung, NO- und Sauerstoffradikalbildung und Aktivierung knorpelkataboler Enzyme.

Ein weiterer Unterschied zwischen den Herstellungsverfahren besteht in der Aktivierung der Thrombozyten vor Applikation, die in einigen Fällen durch Zugabe von Kalziumchlorid, in anderen durch Thrombin oder Kollagen vollzogen wird. Die Aktivierung hat auf den zeitlichen Verlauf der Wachstumsfaktorfreisetzung Einfluss. Thrombin-aktivierte Thrombozyten können die Wachstumsfaktoren sofort freisetzen, während bei Aktivierung durch Kollagen eine langsamere Freisetzung aus dem PRP über 5 Tage resultierte (Harrison et al., 2011). Eine Aktivierung durch Kalziumchlorid, wie sie in manchen Systemen benutzt wird, führt zur Bildung einer dichteren Fibrinmatrix und so zu einer langsamen Ausschüttung von Wachstumsfaktoren über 7 Tage (Foster et al., 2009). Bovines Thrombin als Aktivator führte in der Vergangenheit vereinzelt zu lebensbedrohlichen Koagulopathien aufgrund von Antikörpern gegen die Gerinnungsfaktoren V, XI und Thrombin (Everts et al., 2006; Zehnder and Leung, 1990). Seit 1997 wird der bovine Faktor Va in den Präparaten eliminiert und seitdem wurden keine weiteren Komplikationen beschrieben (Sampson et al., 2008).

Der pH-Wert des PRPs hat ebenfalls Einfluss auf die Ausschüttung einzelner Wachstumsfaktoren. Eine Antikoagulation durch Natrium-Citrat im sauren pH-Bereich führt zu einer erhöhten PDGF-Ausschüttung, während eine Aktivierung bzw. Pufferung durch Bicarbonat in den neutralen bis alkalischen Bereich zur erhöhten Ausschüttung von TGF- β führt, was physiologischerweise späteren Phasen der Wundheilung entspräche (Liu et al., 2002).

Die Wirkung von PRP auf die inflammatorische Phase des Heilungsprozesses von Gewebe kann durch die gleichzeitige Gabe von NSAIDs inhibiert werden (Shen et al., 2005). PRP hat nach bisherigem Kenntnisstand ein komplikationsarmes Anwendungsprofil, da aufgrund der autologen Herkunft keine Abwehrreaktionen oder Krankheitsübertragungen zu erwarten oder beschrieben sind. Es besteht kein mutagener Charakter und die Wachstumsfaktoren im PRP wirken über physiologische Genexpression, Signalkaskaden und Feedback-Mechanismen im Rahmen des natürlichen Wundheilungsprozesses (Sampson et al., 2008).

In der Vergangenheit kam es trotz intensiver Forschung zu uneinheitlichen Ergebnissen in der Beurteilung der chondrogenen und chondroregenerativen Potenz von PRP. Kürzlich konnten im Großtierversuch keine signifikanten Vorteile in Makroskopie, Computertomographie oder Histologie bei der osteochondralen Regeneration von Knorpelknochendefekten am Talus durch Zugabe von PRP erreicht werden (van Bergen et al., 2013). Im Kleintiersversuch für Defekte am medialen Femurkondylus konnte zu Beginn in der PRP-Gruppe eine positive Tendenz in der makroskopischen und mikroskopischen Beurteilung des Reparaturgewebes gezeigt werden. Nach 19 Wochen bestand aber kein Unterschied in den makroskopischen, mikroskopischen oder biomechanischen Eigenschaften des gebildeten Faserknorpels zwischen unbehandelten und PRP-behandelten Tieren (Serra et al., 2013).

In Gegensatz dazu konnte kürzlich im Kleintiermodell gezeigt werden, dass durch den Zusatz von PRP nach Mikrofrakturierung von Knorpelknochendefekten im Kniegelenk nach 6 Wochen eine Chondrozytenschicht mit extrazellulärem Kollagen II in der Defektzone entstand und bessere histologische Scores erhoben werden konnten. Die alleinige Mikrofrakturierung führte zu einer faserknorpeligen Defektdeckung mit nur wenigen Chondrozyten und nur geringer Kollagen II-Produktion. PRP bedingte eine gesteigerte Migration und Stimulation von subchondralen Progenitorzellen, die durch Eröffnung des Markraumes allein nicht erreicht werden konnte. Diese Progenitorzellen spielen eine entscheidende Rolle für die Entstehung eines gelenkknorpelähnlichen Regenerat-gewebes (Hapa, 2013).

Zuvor zeigte sich bei osteochondralen Läsionen am medialen Femurkondylus im Großtiermodell, dass PRP, insbesondere in einem Fibringel eingebracht, nach Mikrofrakturierung verbesserte histologische Scores gegenüber der Kontrollgruppe erreichte. Allerdings wurde keine physiologische Knorpelkonsistenz und –steife erreicht (Milano et al., 2010).

Eine Intraartikuläre Administration von PRP in Gelatine-Hydrogel-Microsphären bei mechanisch induzierter Osteoarthritis im Kleintiermodell führte zu morphologisch und histologisch signifikanter Inhibition des osteoarthrotischen Fortschreitens und gesteigerter Expression von Knorpelmatrixmolekülen in den Chondrozyten (Saito et al., 2009). Auf molekularer Ebene wurden durch Inkubation von Chondrozyten mit PRP Schlüsselmechanismen des

intraartikulären Entzündungsprozesses beeinflusst. Über hepatocyte growth factor (HGF) und TNF- α konnte eine antiinflammatorische und antichemotaktische Wirkung erreicht werden. Verantwortlich dafür war eine reduzierte „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“ (NF κ B)-Aktivität und verminderte Expression von Cyclooxygenase-2 (COX-2) und CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR-4) Rezeptorgenen. So könnte eine Eindämmung des destruierenden Entzündungsprozesses bei Osteoarthritis über hepatocyte growth factor (HGF) und TNF- α erzielt werden (Bendinelli et al., 2010).

Vielversprechend für die klinische Anwendung ist das Ergebnis einer der wenigen prospektiven randomisierten Studien, in der Patienten nach Mikrofrakturierung bei früher Osteoarthritis mit PRP behandelt wurden. Nach 2 Jahren wurden signifikante klinische Verbesserungen der Visuellen analogen Schmerzskala (VAS) und des IKDC (International Knee Documentation Committee)-Score gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt. In einer second-look-Arthroskopie wurde bessere Knorpelqualität, -härte und -belastbarkeit gefunden (Lee et al., 2013). In einer Studie der konservativen Therapie mit intraartikulärer PRP-Injektion ohne Kontrollgruppe wurde wie in mehreren Studien zwar eine signifikante Verbesserung in VAS und IKDC-Score über 12 Monate verzeichnet, es stellte sich jedoch auch eine negative Korrelation zwischen Schwere des Arthrosegrades und klinischen Effekten der PRP-Therapie heraus. Das Alter und der Therapieerfolg waren negativ korreliert (Jang et al., 2013).

Diese Ergebnisse scheinen nur bedingt reproduzierbar zu sein, da in einer aktuellen randomisiert-kontrollierten Studie kein Einfluss von Alter, Geschlecht, Gewicht oder BMI auf das Outcome gezeigt werden konnte. Es wurde eine negative Korrelation zwischen dem Einfluss von PRP auf den Therapieerfolg und dem Arthrosegrad beschrieben. Außerdem wurde eine signifikante klinische Besserung der PRP-Gruppe im Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index (WOMAC) gegenüber der Kontrollgruppe gemessen. Unter konservativer Therapie mit PRP-Injektionen zeigte sich bereits nach 6 Monaten eine Abnahme des Therapieerfolges. Ein Nutzen einer zweifachen PRP Injektion im Abstand von 3 Wochen bestätigte sich jedoch nicht (Patel et al., 2013).

In einer anderen klinischen Studie mit konservativer PRP-4fach-Injektion bei Gonarthrose im Stadium III nach Kellgren-Lawrence zeigte sich innerhalb von 24 Wochen ein signifikant verbesserter WOMAC-Index in der PRP-Gruppe gegenüber einer Hyaluronsäure-4fach-Injektion. Die PRP-Injektionen bedingten keine signifikanten Unterschiede in der Verbesserung des klinischen Outcomes gegenüber niedrigeren Osteoarthritis-Graden, während bei der Hyaluronsäure-Therapie eine negative Korrelation zum Osteoarthritisgrad vorhanden war (Cerza et al., 2012).

In einem Kleinterversuch mit Kollagenase-induzierter Osteoarthritis besaß PRP im Falle einer

mittelgradigen Knorpelschädigung eine größere regenerative Potenz, als bei geringgradiger Knorpeldegeneration (Kwon et al., 2012). Ein weiterer Unterschied in der Anwendung des PRPs ist die Applikationsform. Neben einfacher Injektion, Einbringen als Gel und in Kombination mit HMSCs konnte im Kleinterversuch ein signifikanter Regenerationserfolg durch Einsetzen eines PLGA (Polylactic-glycolic acid)- Trägers mit PRP erzielt werden. 12 Wochen nach Schaffung eines Knorpel-Knochen-Defektes stellte sich ein makroskopisch weißer, gut integrierter, glatter Knorpel mit histologisch runden, chondrozytenartigen Zellen und hohem Glykosaminoglykangehalt der neuen Knorpelmatrix dar. Dieser hyalinartige Knorpel mit gelenkknorpelartiger Architektur füllte im Vergleich zu faserknorpeligem, zerklüftetem Regeneratknorpel in den Kontrollgruppen den Defekt voll auf. Auch die Bildung von subchondralem Knochen zeigte trabekuläre Struktur und Cluster neuer Knochenbildung in der PRP-Gruppe (Sun et al., 2010). Auch bei menschlichen Osteoarthrosedefekten (Outerbridge III-IV) des Knies wurde PRP in einem PGA-Hyaluronsäure-Träger in das Gelenk eingebracht. Nach einem Jahr konnten signifikante Verbesserungen im KOOS (Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score), der visuellen Schmerzskala (VAS), Lebensqualität und den activities of daily living (ADLs) belegt werden. In second-look-Arthroskopien wurde ein gut integrierter, leicht hypertrophierter, palpatorisch fester Knorpel gefunden. Die histologische Auswertung dokumentierte die Bildung eines hyalinähnlichen Gelenkknorpels (Siclari et al., 2011).

1.7. Die Bedeutung der Wachstumsfaktoren und Zytokine im osteoarthrotischen Gelenk

1.7.1 Interleukin 1

Das Zytokin Interleukin 1 hat knorpelkatabole Wirkung und wird außer von Thrombozyten von aktivierten Synoviozyten, Monozyten oder Chondrozyten gebildet. Im Rahmen der osteoarthrotischen Chemotaxis von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten insbesondere in den Gelenkspalt, jedoch auch in die Synovialmembran. Im Kleinterversuch wurde IL-1 zur Induktion einer Arthritis verwendet (van Beuningen et al., 1994).

IL-1 unterdrückt die Extrazellulärmatrix-Produktion in Form von Proteoglykanen und damit auch die Regenerationsmechanismen und stimuliert aktiv deren Abbau. Die Inhibierung der Proteoglykansynthese beruht wahrscheinlich auf einer Verminderung der IGF-1-Sensibilität der Chondrozyten (Schalkwijk et al., 1989). Im Kleinterversuch wurde eine Vermittlung der Knorpelschädigung durch Stickstoffmonoxid (NO) nachgewiesen (van de Loo et al., 1998). Bei Osteoarthritis wurde eine Zunahme der Rezeptordichte von IL-1-Rezeptoren sowie eine

Reduktion der natürlichen IL-1-Rezeptorantagonisten beschrieben (Fernandes et al., 2002). In klinischen Studien an Osteoarthrosepatienten führte die Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen den IL-1-Rezeptor zwar zu einer generellen Abnahme systemischer Entzündungsparameter im Sinne von CRP und Zahl neutrophiler Granulozyten, bezüglich der Osteoarthrose kam es jedoch zu keiner signifikanten klinischen Verbesserungen durch die alleinige IL1R1-Antagonisierung (Cohen et al., 2011).

1.7.2 Tumornekrosefaktor- α

Der tumor necrosis factor- α (TNF- α), der auch als Cachectin bekannt ist, wird von aktivierten mononukleären Phagozyten, aktivierten Synovialozyten und Gelenkknorpelzellen gebildet. Er gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen, die an der Knorpeldestruktion beteiligt sind (Fernandes et al., 2002). Es wurden erhöhte TNF- α -Werte in Synovialmembran, Synovialflüssigkeit, subchondralem Knochen und Knorpel bei Osteoarthrosepatienten gefunden (Abraham and Kroeger, 1999). TNF- α hat eine herausragende Rolle in Bezug auf die anabolen und katabolen Prozesse im Rahmen dieses Krankheitsbildes, da er in der Lage ist, durch Inhibition der anabolen Aktivität der Chondrozyten die Synthese von Extrazellulärmatrixkomponenten wie Kollagen II herunterzuregeln (Lefebvre et al., 1990; Séguin and Bernier, 2003). Ähnlich wie IL-1 stimuliert TNF- α die Produktion von Prostaglandinen und Collagenase in menschlichen Synoviazellen (Beutler and Cerami, 1985). Wie für IL-1 konnte für TNF- α in vitro gezeigt werden, dass es die Chondrozyten zur limitierten Proteolyse von für die Druckbelastung des Knorpels essentiellen chondroitinsulfathaltigen Proteoglykan stimuliert. Der Effekt der beiden Zytokine scheint additiv zu wirken und nicht kompetitiv an einen Rezeptor zu binden, wenngleich IL-1 der stärkere Induktor der Proteolyse zu sein scheint (Saklatvala, 1986).

TNF stimuliert die Ausschüttung von Matrix-Metalloproteasen, die ihrerseits Knorpelmatrixproteine abbauen (Keffer et al., 1991). Für bestimmte Populationen konnte eine starke Assoziation zwischen Polymorphismen der TNF- α -Gen-Promoterregion und der Entehung von Osteoarthrose nachgewiesen werden. Dabei wurde beschrieben, dass ein TNFA-G308A Polymorphismus zu erhöhter TNF- α -Produktion führte und Träger eben jener Allele ein stark erhöhtes Osteoarthrosevorkommen zeigten (Pociot et al., 1991; Shlopov et al., 2000; Balding et al., 2003; Kim et al., 2010). Zusammenfassend muss man dem Tumornekrosefaktor- α nach derzeitigem Kenntnisstand eine überwiegend katabole Wirkung auf den Gelenkknorpel zuschreiben.

1.7.3 Interleukin-6

Interleukin-6 gehört zu den wichtigsten regulatorischen Zytokinen im Rahmen der Destruktions- und Reparatursprozesse der Arthrose. Dieses Zytokin besitzt knorpelanabole und katabole Effekte und wirkt so als Immunmodulator im Rahmen der Entzündungsreaktion. In der Synovia vorkommend scheint es am ehesten von Synovialmembranzellen und Fettgewebe produziert zu werden.

IL-6 werden sowohl eine chemotaktisch bedingte Erhöhung der Entzündungszellzahl im Synovialgewebe zugeschrieben, als auch die Amplifikation der IL-1 induzierten MMP-Synthese und Inhibition der Proteoglykanproduktion (Pelletier et al., 1995). Wie auch für TNF- α und IL-1 β konnte für IL-6 in mehreren Studien eine positive Korrelation zwischen Protein- und mRNA-Erhöhung in der Synovialmembran mit klinischen und histologischen Zeichen der Arthrose gezeigt werden (Kokkonen et al., 2010; Lippross et al., 2011; Pohlers et al., 2005). Osteoarthrotische Chondrozyten zeigten eine signifikant erhöhte IL-6-Produktion gegenüber denen des gesunden Knorpels und eine verminderte Ausschüttung von Glykosaminoglykanen (GAG). Der Extrazellulärmatrix-Turnover wurde in vitro durch exogene Zugabe aber nicht durch endogene IL-6-Erhöhung beeinflusst (Tsuchida et al., 2012).

Im Rahmen der Rheumatoiden Arthritis konnte gezeigt werden, dass durch Tocilizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen den IL-6-Rezeptor, eine klinische Besserung wie auch eine Verminderung der Gelenkspaltverschmälerung und Knorpelabbauparameter erreicht werden konnte (Singh et al., 2012).

Die IL-6-Ausschüttung wird durch katabole Stimuli wie IL-1 β , Prostaglandin E₂ (PGE₂), erhöhte mechanische Belastung und Extrazellulärmatrixkomponenten wie Hyaluronan-Fragmente und Matrilin-3 positiv beeinflusst (Fan et al., 2004; Klatt et al., 2009; Wang et al., 2010a). Es induziert Faktoren wie die Matrixmetalloproteinasen (MMPs), TGF- β , VEGF, die massgeblich am Remodelling des Knorpels beteiligt sind (Hashizume and Mihara, 2009; Pulai et al., 2005; Silacci et al., 1998; Villiger et al., 1993; Wang et al., 2010b).

Die in vitro-Stimulation von Chondrozyten führte sowohl zu anabolen Effekten wie gesteigerter Produktion von tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) (Schaible et al., 2010), als auch zu katabolen Effekten wie Herunterregulierung der Expression von Knorpelmatrixgenen, Inhibition der Proteoglykansynthese und Stimulation der Aggrecanaseproduktion (Flannery et al., 2000; Guerne et al., 1999; Legendre et al., 2003; Porée et al., 2008; Rogerson et al., 2010). IL-6 wirkt stimulierend auf die Chondrozytenproliferation und seine Produktion wird durch IL-1 in der osteoarthrotischen Synovialis stimuliert (Pelletier et al., 1995). Im Kleintiersversuch konnte eine positive Korrelation zwischen Proteoglykansynthese im Knorpel und IL-6

Gehalt in der Synovialflüssigkeit gefunden werden (Venn et al., 1993). Über einen Feedback-Mechanismus führt IL-6 zu einer Begrenzung der Enzymproduktion durch die Induktion der Produktion des tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (MMPs) (van de Loo et al., 1995). Im Kleinterversuch konnte dargestellt werden, dass IL-6 eine Osteoarthritis-protective Rolle zuzukommen scheint, dabei IL-6-knock-out Mäusen eine höhere spontane Arthrose aufkommen kombiniert mit einer verringerten Proteoglykansynthese und Knochendichte auftrat (de Hooge et al., 2005). IL-6 entfaltet seine anabole Wirkung über die Induktion von TIMP-1 (Namba et al., 2007), BMP-7 (Villiger et al., 1993), TGF- β (Rübenhagen et al., 2012), als auch direkt durch die Induktion der Expression von Knorpelmatrixproteinen (Villiger et al., 1993). Erhöhte Serum-IL-6-Spiegel scheinen signifikant mit der Entstehung und der Schwere des Verlaufs von Gonarthrose korreliert zu sein, weshalb IL-6 als möglicher Biomarker für den Progress von Osteoarthritis diskutiert wird (Livshits et al., 2009). Es konnte keine direkte Relation zwischen Alter und IL-6 Erhöhung gefunden werden (Rübenhagen et al., 2012).

1.7.4 Vascular endothelial growth factor

Der vascular endothelial growth factor (VEGF) wird unter anderem von den α -Granula der Thrombozyten sezerniert und ist für eine Förderung der Angiogenese, des endothelialen Zellwachstums und Steigerung der Gefäßpermeabilität bekannt (Dvorak, 2006; Sánchez-González et al., 2012). Er spielt eine Rolle im Rahmen der chronischen Wundheilung aber auch der endochondralen Ossifikation (Bennett et al., 2003).

Es gibt mindestens 4 Subtypen der VEGF bei Säugetieren (VEGF A-D) mit einem gemeinsamen VEGF-Rezeptor (VEGF-R3) (Tammela et al., 2005). Der Rezeptor VEGF-R3 wird ausschließlich von Lymphozyten und Endothelzellen ausgebildet (Partanen et al., 2000) aber auch Neuropilin 1 und 2 fungieren als Rezeptoren für VEGF, wodurch diesem eine Rolle in der neuronalen Entwicklung und embryonalen Angiogenese zukommt (Klagsbrun et al., 2002).

In Thrombozyten und Megakaryozyten und somit im PRP ist VEGF-A (in 3 Isoformen) enthalten (Möhle et al., 1997), welches zu einer Hochregulation der Expression von Urokinase, tissue plasminogen activator, Connexin und Osteopontin (Lucerna et al., 2007) führt. Diese entfalten neben ihrer Rolle im Rahmen des Gerinnungssystems bindegewebsproliferative Wirkung. Dem VEGF werden jedoch auch proinflammatorische Eigenschaften durch die Stimulation der Leukozytenadhäsion am Endothel zugewiesen (Min et al., 2005).

VEGF spielt im Rahmen der synovialen Begleitreaktion bei entzündlichen Gelenkprozessen eine Schlüsselrolle als Regulator der Neovaskularisierung innerhalb der Entzündungsreaktion (Koch et al., 1994; Pufe et al., 2001). Im Rahmen einer Antigeninduzierten Arthritis im Großtiermodell konnten signifikant erhöhte Konzentrationen von VEGF in der Synovialmembran nachgewiesen

werden (Lippross et al., 2011).

Durch Implantation von MDSCs (muscle derived stem cells), die den VEGF-Antagonisten sFlt-1 exprimierten, in osteoarthrotische Mäusekniegelenke konnte durch Antagonisierung von VEGF ein makroskopisch weicher Knorpel ohne Osteophytenbildung entstehen. In den Kontrollgruppen schritt die Osteoarthritis fort und die Differenzierung zu chondralen Zellen wurde durch VEGF inhibiert. Die knorpeldestruktive Wirkung ergab sich aus der Inhibition der Reparaturvorgänge, der Beschleunigung der Degeneration im in vivo- Osteoarthritismodell und der Induktion der Apoptose von Chondrozyten über deren intrinsische Signalkaskade. Bei mesenchymalen Stammzellen unter BMP-4 Einfluss sorgte VEGF-Antagonisierung für anabole Effekte im Sinne einer verbesserten Chondrogenese, Chondroregeneration und reduzierten Apoptose von Chondrozyten (Matsumoto et al., 2009; Mifune et al., 2013).

1.7.5 Transforming growth factor- β

Die Hauptquellen vom transforming growth factor- β (TGF- β) sind der Knochen und die Thrombozyten. Es handelt sich bei TGF- β um ein Polypeptid, das in Fibroblasten die Proliferation und Kollagenproduktion, in Epithelzellen Angiogenese induziert sowie die Proliferation von glatten Muskelzellen fördert. Im Knochen hat der Wachstumsfaktor stimulierende Wirkung auf Osteoblastenproliferation und deren Knochenmatrix-Produktion und kann eine Osteoklasten-Apoptose induzieren. Im Knorpel wirkt es anabol durch Aktivierung von Chondroprogenitorzellen (Eppley et al., 2004; Mehta and Watson, 2008). TGF- β stimuliert mesenchymale Stammzellen zur Einwanderung und Differenzierung im Rahmen der Wundheilung und inhibiert die katabole Wirkung von Interleukin-1. In vitro zeigte sich eine TGF- β -induzierte Expression von mRNA für Kollagen II und Aggrecan in mesenchymalen Stammzellen aus Synovialmembran (Kurth et al., 2007).

TGF- β ist für seine potente Chemotaxis von Entzündungszellen und Fibroblasten bekannt. Es induziert bei intraartikulärer Injektion eine transiente Entzündungsreaktionen und Proliferation von Synovialozyten und antagonisiert die IL-1-bedingte Unterdrückung der Proteoglykansynthese im Gelenkknorpel. Dabei wird die initiale Depletion von Proteoglykanen nicht unterdrückt, die Wiederauffüllung in der Regenerationsphase der extrazellulären Knorpelmatrix jedoch beschleunigt.

Bei der Untersuchung des Einflusses von TGF- β auf die Genexpression und Produktion der Knorpelmatrix-Marker Aggrecan, COMP (cartilage oligomeric matrix protein) und Kollagen II in human mesenchymal stem cells (hMSCs) stellte sich heraus, dass die Expression dieser Matrixmarker TGF- β -abhängig ist. Der stimulierende Effekt des TGF- β auf Differenzierung und Expression von Knorpelmatrixmarkern in hMSCs wurde durch Dexamethason verstärkt,

während Dexamethason alleine nur geringfügig die Expression von Aggrecan, Kollagen und COMP beeinflusste (Derfoul et al., 2006).

Aus Tiermodellen ergaben sich Hinweise, dass sowohl im Rahmen des Progresses der Osteoarthritis als auch mit zunehmendem Alter der Individuen eine Änderung der Wirkweise von TGF- β beziehungsweise dessen favorisierten Signalkaskaden eintritt. Die überwiegend chondroprotektive Rolle wird von knorpelmatrixdestruierenden Effekten über Matrix-Metalloproteasen (MMPs) überwogen.

Die Ausschaltung von TGF- β durch Transfektion mit einem TNF- β Antagonisten im Kleintiermodell führte zu einem signifikanten Schwund an Proteoglykanen der Knorpelmatrix bei experimenteller Osteoarthritis und bestätigte die chondroprotektive Wirkung von TGF- β . (Kraan et al., 2011).

1.7.6 Bone morphogenic protein 4

Das Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) gehört zur transforming growth factor β -Superfamilie und ist ein sekretorisches Signalprotein, das mit den anderen BMPs zunächst als Induktor der Osteogenese beschrieben wurde.

Grundsätzlich sind die BMPs pleiotrope, überwiegend anabole Faktoren, die für Entwicklung, Homöostase und Reparatur verschiedener Gewebe zuständig sind. Vor allem werden sie im Rahmen der Knochen- und Knorpelregeneration und -genese als Induktoren von Differenzierung, Apoptose und Proliferation undifferenzierter Zellen, sowie als Stimulatoren der Extrazellulärmatrixproduktion beschrieben (Bramlage et al., 2006; Kaps et al., 2002).

BMP-4 stimuliert beim Erwachsenen die Synthese von Knorpelmatrix und Chondrozytendifferenzierung (Tsumaki et al., 2002). In der gesunden Synovialis kommt BMP-4 in der oberflächlichen Zellschicht vor, während es im arthrotischen Gelenk eher in den unterliegenden Schichten produziert wird (Bramlage et al., 2006). Auch in Osteophyten des arthrotischen Gelenks konnte BMP-4 vermehrt nachgewiesen werden (Nakase et al., 2003). Insbesondere die Wirkung von bone morphogenic protein 4 auf adulte Stammzellen war wiederholt Gegenstand experimenteller Studien und zeigte in vivo und in vitro eine signifikante Verbesserung der chondrogenen Regeneration (Mifune et al., 2013; Wakitani and Yamamoto, 2002) und eine stärkere Hyalinisierung des neuen Knorpelgewebes (Matsumoto et al., 2009). In humanen osteoarthrotischen Chondrozyten kommt es zur Reexpression von Follistatin, einem BMP-4-Antagonisten, der normalerweise im Rahmen der Embryogenese exprimiert wird, und die anabole Wirkung des BMPs reduziert. Dieser Vorgang wird durch die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und Interferon- γ stimuliert, die im Rahmen des Entzündungsgeschehens im arthrotischen Gelenk vermehrt ausgeschüttet werden (Tardif et al., 2004).

Neuere Studien am Kleintiermodell konnten zeigen, dass BMP-4 über den BMP-RII-Rezeptor eine Signalkaskade stimuliert, die zur vermehrten Synthese von Aggrecan- und Kollagen II als Bestandteilen der hyalinen Knorpelmatrix führt (Wang et al., 2013).

Inzwischen konnte im Kaninchenversuch die Neubildung von Gelenkknorpel aus einem zweischichtigen Hydrogelsystem aus humanen mesenchymalen Stammzellen in einer TGF- β 1- und einer BMP-4-Schicht erreicht werden (Re'em et al., 2012).

1.8. Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Konzentration von verschiedenen Wachstumsfaktoren im postoperativen Hämarthros nach Abrasionsarthroplastik zu analysieren.

Darüber hinaus war für uns von Interesse, die Konzentrationen knorpelanaboler und knorpelkataboler Proteine im PRP zu bestimmen, da dieses als Adjuvans klinisch häufig im Rahmen knorpelregenerativer Eingriffe eingesetzt wird, und sie den Konzentrationsverhältnissen im Hämarthros des postoperativen arthrotischen Kniegelenkes nach markraumeröffnender chirurgischer Therapie gegenüberzustellen.

Der Hintergrund der Fragestellung ist, ob sich durch Einsatz von PRP die Konzentration knorpelanaboler Wachstumsfaktoren im Gelenk steigern ließe, was Rückschlüsse auf den Gebrauch von PRP als Adjuvans in der Therapie der Osteoarthrose zur Augmentation der knorpelanabolen Wachstumsfaktoren und Zytokine gegenüber dem alleinigen postoperativen Gelenkerguss zuließe.

Bisher erfolgten die Vergleiche knorpelanaboler Faktoren im PRP gegenüber denen im venösen Blut. Das Mikromilieu eines postoperativen Gelenkes inklusive Hämarthros entspricht jedoch nicht dem des periphervenösen Blutes, da dort unter anderem bereits durch Thrombozytenaktivierung freigesetzte Wachstumsfaktoren und Zytokine vorhanden sind. Es gibt Hinweise, dass der postoperative Gelenkerguss an sich schon ein Umfeld aus Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Wachstumsfaktoren darstellt, die auch an der bisher gezeigten chondroneogenen Wirkung des PRP beteiligt sind.

2. Material und Methoden

2.1. Patienten nach Abrasionsarthroplastik

In dieser Studie wurde der postoperative Wunderguss, Hämarthros, nach Kniegelenksarthroskopien und das von gesunden Probanden gewonnene PRP untersucht, gegenübergestellt und der Wachstumsfaktor- und Zytokingehalt verglichen.

Eingeschlossen wurden 8 Proben von Patienten nach Abrasionsarthroplastik des Kniegelenkes bei einem Knorpelschaden Grad IV nach Outerbridge. Alle Patienten erhielten 2,5 mg Dexamethason intraartikulär, um die postoperative Entzündungsreaktion zu senken. Das Alter der Patienten lag im Mittel bei 44 Jahren (37 – 53). 2 Patienten waren weiblich, 6 männlich. Die Durchführung dieser Studie erfolgte mit Genehmigung der Ethikkommission Kiel (Aktenzeichen D 412/11).

2.2. Gewinnung und Verarbeitung von Hämarthros

Die Hämarthrosproben wurden 21 Stunden ($\pm 2,5$) nach Abrasionsarthroplastik aus der Flasche der intraoperativ gelegten Redondrainage entnommen. Zur Gewinnung von Serum wurde unter einer Sterilbank 10 ml Hämarthros aus den Drainagen in sterile Falcon-Röhrchen gefüllt und bei 1864 g (g = mittlere Erdschwerebeschleunigung) für 10 min zentrifugiert, die zellfreie Phase abpipettiert und für die weitere Testung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ kryokonserviert.

2.3. Probanden zur PRP-Gewinnung

Das PRP wurde von 8 gesunden Probanden im Alter von 25 bis 40 Jahren gewonnen. Es wurden jeweils 100 ml periphervenöses Blut in EDTA-Monovetten (Sarstedt, Kalium-EDTA, 9 ml, EN 14820) abgenommen.

Vor der Gewinnung des PRP aus den Vollblutproben wurde ein maschinelles Hämatogramm erstellt, um Blutbildveränderungen und insbesondere Thrombozytenzahlen ausserhalb des Normbereiches ausschliessen zu können, die zu Konzentrationsunterschieden bei der Herstellung des PRP hätten führen können. Die Durchführung der Studie erfolgte mit Genehmigung der Ethikkommission Kiel (Aktenzeichen D 514/13).

2.4. Herstellung von platelet-rich plasma

Aus dem Vollblut der 8 gesunden Probanden wurde umgehend gemäss folgendem Protokoll (Verrier et al., 2010) PRP hergestellt: Zunächst wurde das antikoagulierte Blut unter einer Sterilbank in sterile Falcon-Röhrchen umgefüllt (zwei à 50 ml pro Proband). Anschliessend wurden diese für 15 Minuten mit 200 g zentrifugiert (Hardspin; Biofuge primo R, Heraeus), um Erythrozyten und Leukozyten von Plasma und Thrombozyten zu trennen. Danach wurde die Plasma- und Thrombozytenphase abpipettiert und die Erythrozyten- und Leukozytenphase verworfen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Plasma- und Thrombozytenphase über 10 Minuten bei 2000 g (Softspin), um das Plasma von den Thrombozyten und möglichen restlichen Erythrozyten und Leukozyten zu trennen, welche sich nun als Pellet am Boden des Röhrchens absetzen. Schliesslich wurden die sedimentierten Thrombozyten auf 1/10 des initialen Blutvolumens (5 ml) im Falcon-Röhrchen resuspendiert, nachdem der Überstand, das sogenannte Platelet-poor- Plasma (PPP) abpipettiert wurde. Das so gewonnene PRP wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.5. Quantitative Bestimmung der Zytokine und Wachstumsfaktoren

Die Zytokine Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) und der Wachstumsfaktor vascular endothelial growth factor (VEGF) wurden im PRP und HämARTHROS sowie in einer Serum- und Plasma-Kontrollgruppe (n=5) mittels Luminex quantitativ bestimmt. Die transforming growth factor β (TGF- β)-Konzentration in PRP, Serum und Plasma wurde ebenfalls mit Luminex bestimmt. Die TGF- β -Konzentration der HämARTHROSproben wurde mittels konventionellem Sandwich-ELISA bestimmt.

2.5.1. ELISA

Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein Verfahren, mit dem in dieser Untersuchung die quantitative Bestimmung der Wachstumsfaktoren und Zytokine im PRP, HämARTHROS, peripheren venösen Serum und Plasma mittels eines sogenannten Sandwich-ELISA (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) durchgeführt wurde. Prinzipiell basiert das Verfahren auf der Nutzung von Antikörpern zur Fixierung als auch Markierung des gesuchten Proteins. Zunächst wird das Protein von Antikörpern gebunden, deren Fc-Teil auf einer Platte fixiert ist, um von einem weiteren biotinylierten Antikörper gebunden zu werden. Anschliessend wird durch Zugabe von Streptavidin-gekoppelter Meerrettich-Peroxidase eine Biotin-Streptavidin-Verbindung geschaffen. Die so gebundene Peroxidase führt bei Exposition des Substrats Tetramethylbenzidin zu einem Farbumschlag.

Zur Vorbereitung der Messung werden 96-well Mikrotiterplatten mit 100 µl/well des gewählten Bindungsantikörpers in phosphate buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7.2 - 7.4) verdunstungsgeschützt inkubiert. Die Platte wird unmittelbar verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Danach wird der Inhalt der wells aspiriert und die Platten mit 400 µl/well Waschpuffer (0,05% Tween® 20 in PBS, pH 7,2-7,4) gewaschen, was dreimal wiederholt wird. Nach jedem Waschgang muss jegliche Flüssigkeit entfernt werden.

Anschließend werden die unspezifischen Bindungsstellen auf den Platten durch Inkubation mit 300 µl/well Blockpuffer (5% Tween® 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate, CAS-Nr.: 9005-64-5) in PBS; im Falle der quantitativen Analyse von VEGF zuzüglich 5% Sucrose) für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Daraufhin wird der vorbeschriebene Waschvorgang mit 400 µl/well Waschpuffer wiederholt.

Nun sind die Platten für die Zugabe der zu analysierenden Proben präpariert. Die Platten werden mit je 100 µl/well der zu untersuchenden Hämarthros-, PRP-, Serum- und Plasmaproben sowie die Standardreihen mit Reagent Diluent (1% bovines Serumalbumin (BSA; Albumin EIA & RIA grad, cat.: A0850.0050, Applichem) in PBS, pH 7,2-7,4) versehen, abgeklebt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Aspiration des Inhaltes der wells und ein erneuter Waschvorgang erfolgt im Anschluss, bevor 100 µl/well des Suchantikörpers in Reagent Diluent hinzugegeben wird, die Platten abgeklebt und für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert werden.

Nach erneutem vorbeschriebenem Waschvorgang mit Waschpuffer wird 100 µl Streptavidin-konjugierte Meerrettichperoxidase hinzugegeben und unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und eine weitere Aspiration und Waschgang der wells (s.o.) folgt. Danach wird die Farbreaktion durch die Zugabe von 100 µl Substratlösung (Tetramethylbenzidin-Wasserstoffperoxid -1:1-Mischung; Cat.: T0440-100ml; Sigma) ermöglicht und die Platten weitere 20 Minuten inkubiert. Schließlich werden 50 µl Stopp-Lösung (2NH₂SO₄) pro well zugegeben und der Inhalt vorsichtig gemischt.

Die quantitative Analyse erfolgt unmittelbar anschließend durch photometrische Messung der optischen Dichte bei 450 nm Wellenlänge (550 nm Referenzwellenlänge) und Interpolierung mit Hilfe der Standardkurve. Letzteres erfolgt mit Hilfe des Programms BIOLISE (SLT Labinstrumente Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland).

Alle Schritte wurden unter Berücksichtigung der Herstelleranleitungen und Verdünnungsangaben für Test-Antikörper und Avidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat durchgeführt. Im Falle von TGF-β war noch eine Vorbereitung der Proben nötig. So wurde die latente, in eine immunoreaktive TGF-β-Form durch zehnminütige Inkubation mit Säure und

Harnstoff und anschließende Pufferung mit einer Base überführt (Hartz, 2012).

2.5.2 LUMINEX

Bei der LUMINEX xMAP Technologie handelt es sich um eine Weiterentwicklung der ELISA-Technologie in Kombination mit der Durchflusszytometrie, was insbesondere die Ausschöpfung des Probenmaterials als auch die Anzahl der parallel quantifizierbaren Proteine erhöht (bis zu 100 verschiedene Proteine aus 50 µl). Dies wird durch die Verwendung von Beads, 5,6 µm große sphärische Polystyrolpartikel, erreicht, die als Festphase der Nachweisreaktion dienen. Der Boden der 96-well-Luminex-platte besteht aus einem Mikrofilter. Die zu detektierenden Proteine binden im well an diese Mikrosphären und werden wiederum durch ein Enzym-Antikörper-Konjugat gebunden, das die Katalyse der Nachweisreaktion ermöglicht. Anschließend wird eine bestimmte Anzahl von Beads durch einen roten Laser anhand ihrer internen Fluoreszenz identifiziert und mit Hilfe einer vorher angelegten Zuordnungstabelle dem gesuchten Protein zugeordnet, was dem qualitativen Teil der Messung entspricht. Es schließt sich die quantitative Analyse durch Messung der enzymatisch umgesetzten Farbstoffmenge, die mit der Anzahl gebundener Proteine korreliert mit einem weiteren Laser an.

2.6. Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse und graphischen Darstellung wurde das Programm GraphPad Prism 6 (Graphpad Software Inc., La Jolla, USA) verwandt. Der Vergleich der Gruppen untereinander basierte auf einem Rangsummentest und erfolgte im Rahmen einer Varianzanalyse durch den Kruskal-Wallis-H-Test. Das Signifikanzniveau wurde auf $p = 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Interleukin-1

Interleukin-1, das als vor allem knorpelkataboles Zytokin massgeblich an der Unterhaltung der Entzündungsprozesse und dem Extrazellulärmatrix-Abbau beteiligt ist, war im PRP gegenüber dem Hämarthros nicht signifikant erhöht messbar ($p < 0,05$).

Der Median lag für die Hämarthrosgruppe bei 0,75 pg/ml gegenüber 4,81 pg/ml im PRP, die Mittelwerte bei 1,79 pg/ml mit einer Standardabweichung von 2,18 pg/ml gegenüber 5,16 pg/ml mit einer Standardabweichung von 2,93 pg/ml.

Es bestanden signifikante Unterschiede zwischen Hämarthros und Plasma, in dem IL-1 mit einem Median von 10,46 pg/ml, Mittelwert von 10,83 pg/ml und Standardabweichung von 6,9 pg/ml. Die Konzentration von IL-1 war im Plasma gegenüber Hämarthros signifikant erhöht. Im Serum betrug die Konzentration von Interleukin-1 im Mittel 7,38 pg/ml mit einer Standardabweichung von 118,8 pg/ml und einem Median von 9,86 pg/ml.

Zwischenden Gruppen Plasmavs.Serum,Plasmavs.PRP,Serumvs.PRPundSerumvs.Hämarthros sowie PRP vs. Hämarthros bestanden keine signifikanten Konzentrationsunterschiede ($p < 0,05$).

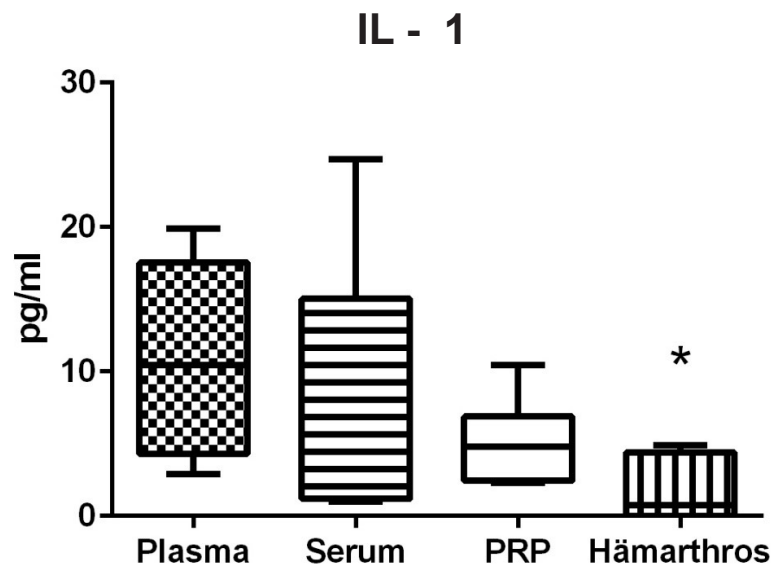


Abbildung 1: Messung von IL-1 im Hämarthros 22 Stunden nach AAP, im PRP sowie Plasma und Serum mittels LUMINEX-Assay ($p < 0,05$).

* Signifikanz Hämarthros vs. Plasma

3.2. Tumornekrosefaktor- α

Der Tumornekrosefaktor- α als proinflammatorisches Zytokin induziert die Apoptose von Chondrozyten und mit Interleukin-1 zusammen den Untergang von Knorpelmatrix.

TNF- α wurde im PRP gegenüber dem Hämarthros in signifikant höherer Konzentration gefunden. Der Median der Konzentration von TNF- α für die Hämarthrosgruppe war 3,61 pg/ml gegenüber 197,0 pg/ml in der PRP-Gruppe. Der Mittelwert im Hämarthros lag bei 26,46 pg/ml mit einer Standardabweichung von 67,02 pg/ml gegenüber 212,8 pg/ml mit einer Standardabweichung von 116,8 pg/ml im PRP.

Im Serum fand sich gegenüber Hämarthros eine signifikant höhere Konzentration von TNF- α mit einem Median von 263,8 pg/ml. Der Mittelwert betrug 265,3 pg/ml mit einer Standardabweichung von 118,8 pg/ml.

Im Plasma betrug die Konzentration von Tumornekrosefaktor- α im Mittel 91,78 pg/ml mit einer Standardabweichung von 65,54 pg/ml und einem Median von 61,45 pg/ml. Zwischen den übrigen Gruppen bestanden keine signifikanten Konzentrationsunterschiede ($p < 0,05$).

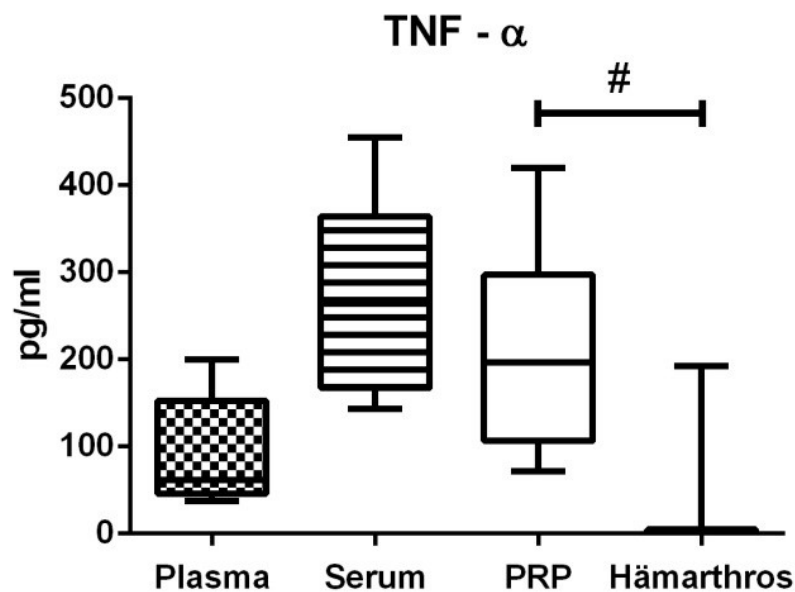


Abbildung 2: Messung von TNF- α im Hämarthros 22 Stunden nach AAP, im PRP, Plasma und Serum mittels LUMINEX-Assay ($p < 0,05$).

Signifikanz PRP vs. Hämarthros

3.3. Interleukin-6

Interleukin-6, das als eines der wichtigsten regulatorischen Zytokine der Destruktions- und Umbauprozesse im osteoarthrotischen Gelenk beschrieben worden ist, zeigte keine signifikanten Konzentrationsdifferenzen zwischen platelet-rich plasma, Hämarthros, Plasma und Serum. Der Median der Konzentration von IL-6 aus den Hämarthros-Proben lag bei 386,5 pg/ml mit einem Mittelwert von 688,5 pg/ml und einer Standardabweichung von 837,8 pg/ml. In der PRP-Gruppe betrug der Median 701,4 pg/ml mit einem Mittelwert von 871,8 pg/ml und einer Standardabweichung von 744,0 pg/ml. Auch gegenüber Plasma und Serum ergaben sich keine signifikanten Konzentrationsunterschiede von IL-6 ($p < 0,05$).

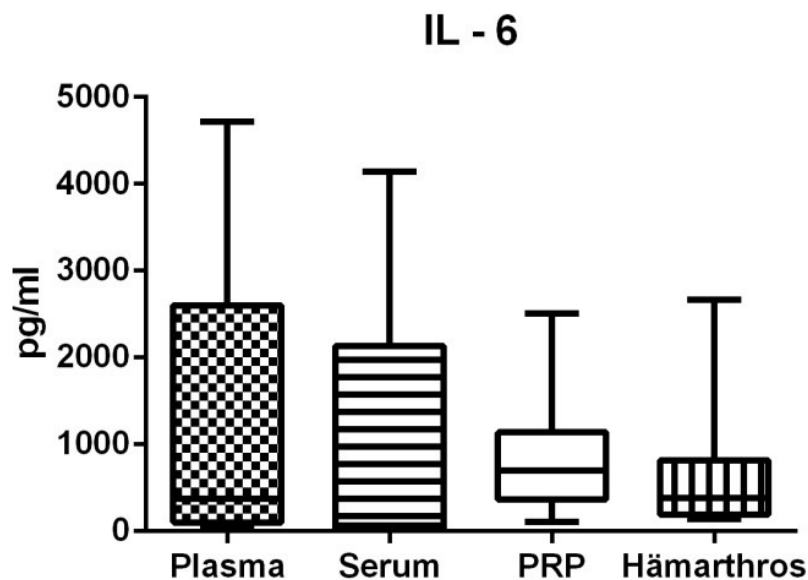


Abbildung 3: Messung von IL-6 im Hämarthros 22 Stunden nach AAP, im PRP, Plasma und Serum mittels LUMINEX-Assay ($p < 0,05$)

3.4. Vascular endothelial growth factor

Der vascular endothelial growth factor ist durch die Induktion von Vaskularisation essentieller Bestandteil einer jeden Geweberegeneration und eines jeden Reparaturprozesses. Seine Rolle im zeitlichen Verlauf der Knorpelregeneration und im Rahmen chronisch-entzündlicher Prozesse deutet jedoch auch auf ein proinflammatorisches und knorpelkataboles Wirkspektrum hin.

Es ergaben sich keine signifikanten Konzentrationsunterschiede von VEGF zwischen Hämarthros und PRP. Im Hämarthros lag der Median bei 287,7 pg/ml und im PRP bei 435,0 pg/ml. Der Mittelwert der VEGF-Konzentration lag bei 405,4 pg/ml im Hämarthros mit einer Standardabweichung von 455,1 pg/ml gegenüber 490,3 pg/ml mit einer Standardabweichung von 294,1 pg/ml im PRP.

Gegenüber der Konzentration von VEGF im Plasma waren die Werte sowohl im PRP, als auch im Hämarthros signifikant erhöht. Der Median der Plasmakonzentration lag bei 19,0 pg/ml. Der Mittelwert betrug 21,1 pg/ml mit einer Standardabweichung von 8,76 pg/ml. Gegenüber den Serumkonzentrationen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der VEGF-Konzentration in PRP, Hämarthros und Plasma ($p < 0,05$).

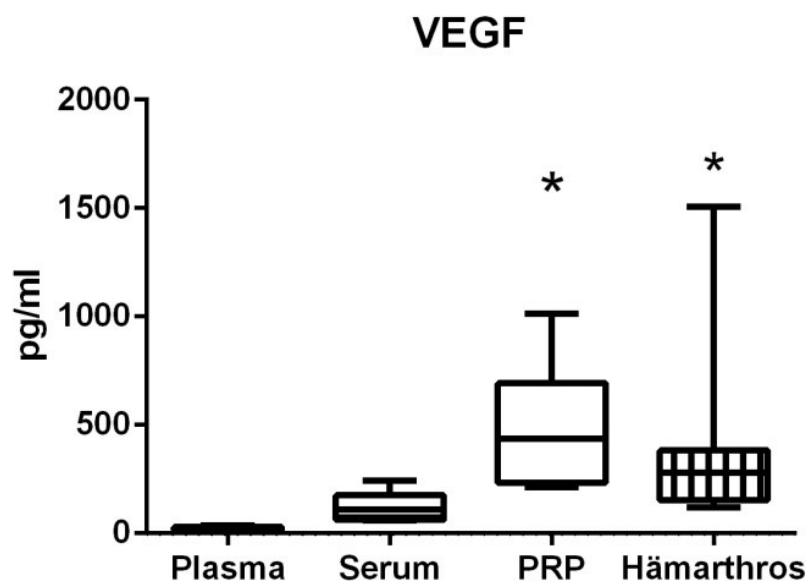


Abbildung 4: Messung von VEGF im Hämarthros 22 Stunden nach AAP, im PRP, Plasma und Serum mittels LUMINEX-Assay ($p < 0,05$).

* Signifikanz vs. Plasma

3.5. Transforming growth factor- β

Der transforming growth factor- β wirkt bei der Regeneration von Knorpelgewebe durch die Aktivierung von Chondroprogenitorzellen, die Induktion von Kollagen II- und Aggrecan und durch die Antagonisierung des IL-1-vermittelten Proteoglykan-Abbaus.

In unseren Messungen war die Konzentration von TGF- β im PRP signifikant gegenüber dem Hämarthros erhöht. Der Median im Hämarthros betrug 18,1 ng/ml verglichen mit 46,37 ng/ml in der PRP-Gruppe. Der Mittelwert im Hämarthros betrug von 19,46 ng/ml mit einer Standardabweichung von 4,31 ng/ml gegenüber einem Mittelwert von 46,32 ng/ml mit einer Standardabweichung von 4,71 ng/ml im PRP.

Die Konzentration von TGF- β war im PRP auch gegenüber dem Plasma signifikant erhöht. Der Median für die Plasmakonzentration betrug 3,79 ng/ml bei einem Mittelwert von 5,07 ng/ml mit einer Standardabweichung von 2,27 ng/ml. Gegenüber der Serumkonzentration von TGF- β zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Hämarthros, PRP oder Plasma ($p < 0,05$).

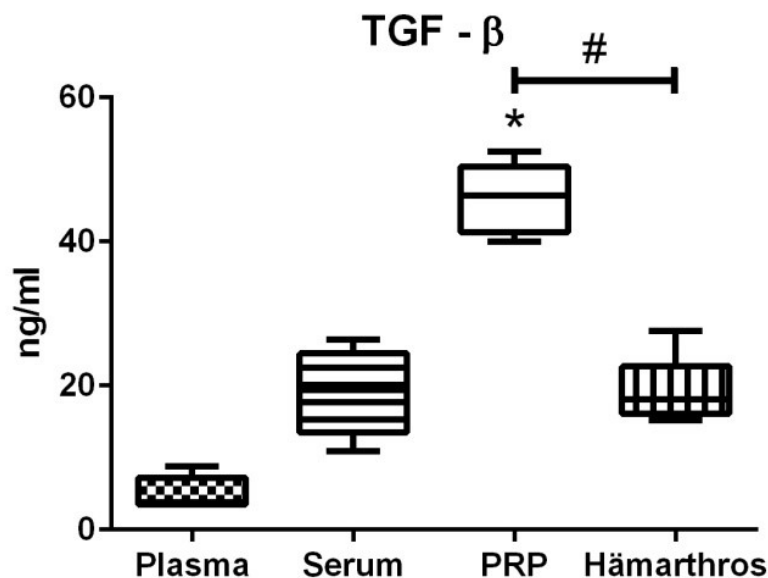


Abbildung 5: Messung von TGF- β im Hämarthros 22 Stunden nach AAP, im PRP, Plasma und Serum mittels ELISA ($p < 0,05$).

Signifikanz PRP vs. Hämarthros

* Signifikanz vs. Plasma

3.6. Bone morphogenic protein 4

Das BMP-4 nimmt vor allem über Differenzierung und Proliferation von Chondrozyten sowie durch die direkte positive Beeinflussung der Knorpelmatrixsynthese an der Knorpelregeneration teil. Bone morphogenic protein 4 war im PRP sowohl gegenüber dem Plasma als auch HämARTHROS in signifikant erhöhter Konzentration nachweisbar. Im PRP lag der Median bei 5195 pg/ml mit einem Mittelwert von 5484 pg/ml und einer Standardabweichung von 1847 pg/ml.

Im HämARTHROS betrug der Median der BMP-4-Konzentration 446,0 pg/ml mit einem Mittelwert von 485 pg/ml und einer Standardabweichung von 130,2 pg/ml. Im Plasma lag der Median bei 509,0 pg/ml mit einem Mittelwert von 400,8 pg/ml und einer Standardabweichung von 181,1 pg/ml. Zwischen den Konzentrationen von BMP-4 von HämARTHROS, Serum und Plasma bestanden keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$).

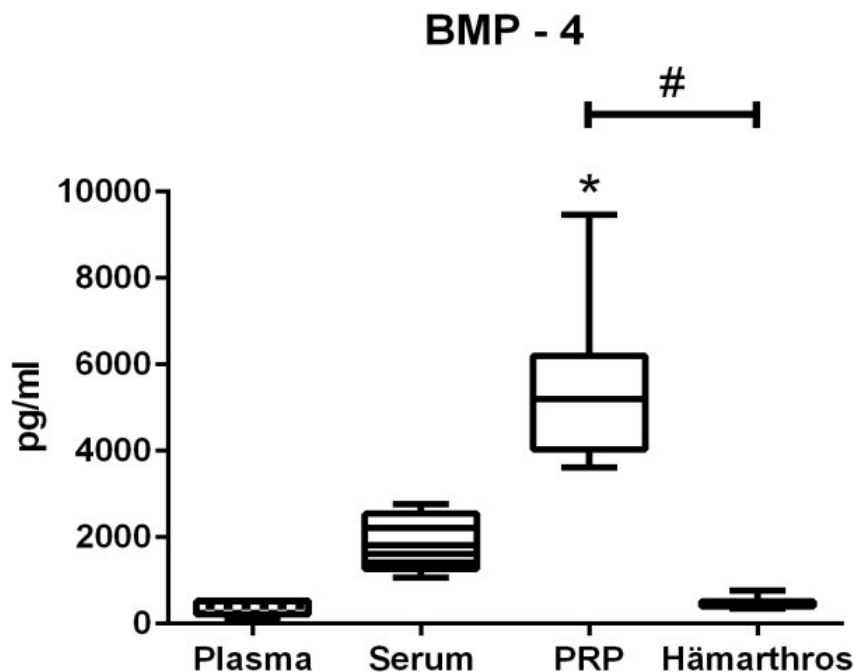


Abbildung 6: Messung von BMP-4 im HämARTHROS 22 Stunden nach AAP, im PRP, Plasma und Serum mittels LUMINEX-Assay ($p < 0,05$).

Signifikanz PRP vs. HämARTHROS

* Signifikanz vs. Plasma

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Konzentration verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokine, die in die Knorpelregeneration involviert sind, im postoperativen Hämarthros nach Abrasionsarthroplastik und im PRP gemessen. Es wurden ausschließlich Proben aus osteoarthrotischen Kniegelenken mit vollschichtigen Knorpelschäden (Grad IV nach Outerbridge) nach Abrasionsarthroplastik und intraoperativer Dexamethasongabe gewählt. Diverse wissenschaftliche Arbeiten schrieben bisher dem PRP chondrogene Potenz und antiinflammatorische Eigenschaften zu und es existieren mittlerweile verschiedene Systeme zur Herstellung von autologem PRP für die peri- oder postoperative intraartikuläre Injektion. Bisher wurde nicht im direkten Vergleich beschrieben, ob die Zytokine und Wachstumsfaktoren natürlicherweise bereits im Hämarthros vorliegen und in welcher Funktion sie dort den Regenerationsprozess beeinflussen.

Bei der Abrasionsarthroplastik kommt es durch die Eröffnung des subchondralen Knochens zum Anschluss an Knochenmark und Gefäßversorgung des sonst avaskulären Knorpels, was zu einer Ergussbildung mit Aktivierung von sonst in der Gelenkhöhle nicht vorkommenden Thrombozyten führt.

Im Hämarthros und PRP lag in unseren Messungen das proinflammatorische und knorpelkatabole Interleukin-1 nur in geringen Mengen vor. Dieses Zytokin stimuliert aktiv den Abbau von Knorpelmatrix und wird in klinischen Studien wie im Tiermodell als Induktor arthrotischer Knorpelschädigung beschrieben. In der Zellkultur konnte eine IL-1- und TNF- α -induzierte Chondrozytendegeneration durch PRP antagonisiert werden und auf einer Kollagenmatrix die Chondrogenese und Chondrozytenhomöostase gefördert werden (Wu et al., 2011).

Für das proinflammatorische Zytokin IL-1, das in unseren Messungen keine signifikante Konzentrationsdifferenz gegenüber dem Hämarthros aufwies, konnte kürzlich gezeigt werden, dass Chondrozyten, die unter Entzündungsbedingungen mit IL-1 kultiviert wurden, durch Zugabe eines PRP-Derivates die IL-6- und IL-8-Produktion drastisch steigerten. Nach dieser initialen Steigerung erfolgte eine Reduktion der Aktivität der Cyclooxygenase-2 und NF κ B, die für die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF- α eine essenzielle Rolle spielt (Pereira et al., 2013). Diese Beobachtung verdeutlicht die Notwendigkeit von wiederholten Analysen der Wachstumsfaktorkonzentrationen im zeitlichen Verlauf des Wundheilungsprozesses mit und ohne adjuvante Gabe von PRP.

In vitro fand bei Zugabe von PRP zu osteoarthrotischen humanen Chondrozyten keine weitere Steigerung der IL-1-induzierten Genexpression von MMP 13 und NO statt. Außerdem wurde die IL-1-induzierte NF κ B-Aktivierung auf Kontrollniveau reduziert, ebenso wie die IL-1-induzierte

ADAMTS4 und prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) - Expression. So wurde die IL-1-induzierte Suppression von Aggrecan und Kollagen II wieder vermindert (van Buul et al., 2011). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass knorpelkatabol proinflammatorische Zytokine zwar im PRP vorkommen, bei exogener Zufuhr im Verbund mit den anderen Wachstumsfaktoren aus den α -Granula jedoch nicht zu einer Augmentation der knorpelkatabolen Effekte führen müssen.

Die Zugabe von PRP zu humanen Makrophagen, die nach Stimulation mit IL-1 eine gesteigerte Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-8 und TNF- α aufwiesen, bewirkte eine Senkung der Expression proinflammatorischer Zytokine (O'Shaughnessy et al., 2011).

Der Tumornekrosefaktor- α , der agonistisch und additiv zu IL-1 wirkt, ist ein Induktor der Extrazellulärmatrix-Proteolyse und Chondrozyten-Apoptose. Dieses Zytokin lag im PRP gegenüber dem Gelenkerguss signifikant erhöht vor, was für eine mögliche proinflammatorische Potenz des PRP im Vergleich zum postoperativen Hämarthros sprechen könnte. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass TNF- α auch im physiologischen Blutserum in signifikant erhöhter Konzentration gegenüber dem Hämarthros und sogar in höherer Konzentration als im PRP vorkam.

Für den proinflammatorischen Wachstumsfaktor VEGF, der im Rahmen der Arthrose eher als Schlüsselenzym der inflammatorischen Hypervaskularisation für die entzündlichen Gelenkveränderungen und synoviale Begleitentzündung gilt, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Vorkommen im Gelenkerguss und dem PRP gezeigt werden. Neben der proinflammatorischen Wirkung ist jedoch die essentielle Bedeutung von VEGF für die notwendige Revaskularisation und damit Regeneration von Gewebe zu berücksichtigen.

Interleukin-6 als Immunmodulator zeigte ebenfalls keine signifikante Differenz zwischen PRP und Hämarthros. Für das Zytokin IL-6 wurde die Hemmung knorpelkataboler Zytokine und Induktion knorpelanaboler Wachstumsfaktoren und Expression von Knorpelmatrixproteinen beschrieben. Auf der anderen Seite induziert es knorpelkatabole Faktoren und somit den Abbau von Knorpelmatrixproteinen. Der Serumspiegel korreliert signifikant mit Schwere und Verlauf der Gonarthrose (Livshits et al., 2009). Eine Erhöhung von IL-6 kann daher sowohl durch eine systemische Erhöhung im Rahmen des Erkrankungsbildes, als auch durch die modulierende Antwort auf proinflammatorische und knorpelkatabole Zytokine im Gelenk bedingt sein. Daher ist als Vorteil anzusehen, dass keine signifikant erhöhten IL-6-Spiegel nachzuweisen waren. Es ist zu berücksichtigen, dass in dieser Untersuchung PRP aus dem Blut gesunder Probanden gewonnen wurde und somit pathologische Schwankungen des basalen IL-6-Spiegels bei Osteoarthrosepatienten bewusst vermieden wurden.

Für den transforming growth factor- β mit nachgewiesener chondroregenerativer und

chondroprotektiver Potenz konnte eine signifikant höhere Konzentration im platelet-rich-plasma gemessen werden. Der Nutzen für die Knorpelregeneration könnte in der Induktion von Knorpelmatrixproteinen, der Stimulation mesenchymaler Stammzellen und Inhibition knorpelkataboler Effekte von IL-1 bestehen (Broderick et al., 2005; van Beuningen et al., 1994). Interessanterweise - insbesondere im Hinblick auf die intraoperative Gabe von Dexamethason bei den Patienten nach AAP in dieser Arbeit - wurde der stimulierende Effekt von TGF- β auf Differenzierung und Expression von Knorpelmatrixmarkern in hMSCs durch Dexamethason verstärkt. Dagegen beeinflusste Dexamethason alleine nur geringfügig die Expression von Aggrecan, Kollagen und COMP (Derfoul et al., 2006). Über die reine autologe Wachstumsfaktorthherapie hinaus könnte die kombinierte Gabe von Steroiden mit PRP die knorpelanabole Wirkung von PRP noch augmentieren.

Bone morphogenetic protein 4 zeigte in unseren Messungen eine signifikant erhöhte Konzentration im PRP gegenüber Hämarthros. Der mögliche Nutzen einer Verwendung von PRP nach AAP besteht in der Induktion der Knorpelmatrixproduktion (in Form von Aggrecan und Kollagen II) und in der Wirkung auf die Differenzierung und Einwanderung von mesenchymalen Stammzellen. Insbesondere nach knochenmarkseröffnender Gelenkoperation wie der AAP könnte die Wirkung auf MSCs aus dem Markraum von großer Bedeutung sein. Die potenzielle Induktion von Osteophytenwachstum durch BMP-4, die im Nagetiermodell als mögliche Komplikation einer überphysiologischen Konzentration nach PRP-Injektion beschrieben wurde, ist bei einzelnen Gaben unwahrscheinlich, muss aber im Langzeit-followup evaluiert werden (Bramlage et al., 2006; Mifune et al., 2013).

Zur Beurteilung des Einflusses von PRP auf die postoperative Knorpelregeneration durch lokale Augmentation oder Reduktion von Wachstumsfaktoren ist auch die mögliche Funktion anderer Wachstumsfaktoren, die in den α -Granula der Thrombozyten enthalten sind zu berücksichtigen. Im Zusammenhang mit der Gabe von PRP in das osteoarthrotische Gelenk wurde zum Beispiel die Rolle von Insulin-like-growth-factor-1 (ILGF-1), platelet derived growth factor (PDGF, insbesondere das Homodimer PDGF-BB) oder basic fibroblast growth factor (bFGF) beschrieben. Diese könnten in zukünftigen Analysen von PRP in Bezug auf seine chondroregenerative Potenz Eingang finden.

Wir haben in dieser Arbeit PRP und Hämarthros unterschiedlicher Individuen gegenübergestellt, was interindividuelle Schwankungen und Unterschiede unberücksichtigt lässt. So ist zum Beispiel für IL-6 eine basale Serumspiegelerhöhung bei Osteoarthrosepatienten beschrieben. Eine solche Erhöhung ist im Serum unserer gesunden Probanden der PRP-Gruppe nicht anzunehmen. Daher könnten unterschiedliche Zytokin- und Wachstumsfaktorkonzentrationen entstehen, wenn das PRP wie in der klinischen Anwendung aus dem Serum des Patienten

selbst gewonnen wird, was sowohl die proinflammatorischen Eigenschaften wie auch die knorpelanabolen Eigenschaften beeinflussen könnte. Um den Einfluss der bisher wenig beschriebenen systemischen Veränderungen von Zytokin- und Wachstumsfaktoren bei Arthrosepatienten sowie die durch mögliche Komorbiditäten verursachten Serumveränderungen für eine grundlegende Betrachtung der chondrogenen Potenz von PRP gering zu halten, wählten wir statt autologen Proben Vollblut von gesunden, jungen Probanden für die Herstellung und Analyse des PRP.

Für VEGF ist ein erheblicher interindividueller Unterschied in der Ausschüttung bei konstanter Thrombozytenzahl beschrieben. Unsere Messwerte der Hämarthros-Gruppe zeigten ebenfalls stark abweichende Konzentrationen der Wachstumsfaktoren und Zytokine, die nicht auf eine Normalverteilung schliessen lassen. Damit ist die Möglichkeit zur uneingeschränkten Beurteilbarkeit der regenerationsadjuvanten Wirkung von PRP aufgrund der Konzentrationsverhältnisse von anabolen zu katabolen Faktoren reduziert. Hierzu wären umfassendere Untersuchungen, insbesondere von Gelenkerguss und PRP desselben Individuums nötig.

Es bleibt die Frage, inwieweit eine unterschiedliche Thrombozytenzahl im Hämarthros aufgrund individueller Veranlagung, Komorbiditäten oder im Rahmen der osteoarthrotischen Entzündungsreaktion mit einer unterschiedlichen Bereitstellung von Wachstumsfaktoren korreliert. Für den vascular endothelial growth factor konnte gezeigt werden, dass keine lineare Beziehung zwischen Thrombozytenkonzentration und VEGF-Ausschüttung besteht (Eppeley et al., 2004). In wie weit dies für die übrigen untersuchten Wachstumsfaktoren gilt, bleibt noch zu untersuchen.

Die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen aus den Thrombozyten im Hämarthros sowie im PRP bedingt die vorherige Aktivierung, für die verschiedene physiologische als auch, im Falle von PRP, artifizielle Wege in Frage kommen. Die Thrombozyten im Hämarthros sind bereits aktiviert, da sie den natürlichen Aktivatoren wie Thrombin und Kollagen im Wundbett ausgesetzt sind. Deshalb ist von einer beginnenden Degranulation der Thrombozyten im Gelenk – abhängig von der Expositionszeit – auszugehen, bevor sie aus der Redon-Drainage entnommen werden. Obwohl die Patienten in dieser Studie prophylaktisch antikoaguliert waren, kommt es zu einer Fortsetzung der Aktivierung bzw. Degranulation außerhalb des Körpers, da sich kein zugesetztes Antikoagulant in der Redondrainage befindet. Es ist daher nicht abschließend zu klären, inwiefern die von uns gemessenen Konzentrationsverhältnisse tatsächlich denen im postoperativen Kniegelenk entsprechen. Einerseits könnten Wachstumsfaktoren und Zytokine bereits vor Ablauf in die Drainage konzentrationswirksam ausgeschüttet, gebunden und abgebaut worden sein. Dies würde zur Messung niedrigerer Konzentrationen an Wachstumsfaktoren als

tatsächlich am Knorpel vorkommend führen. Andererseits könnten die Wachstumsfaktoren erst später durch exogene Manipulation im Rahmen der Zentrifugation freigesetzt worden sein. In letzterem Fall stünden sie zuvor den Reparaturprozessen im postoperativen Knorpelknochendefekt nicht zur Verfügung.

Die vorzeitige Aktivierung der Thrombozyten im Hämarthros schränkt die Vergleichbarkeit der Konzentrationsverhältnisse in PRP und Hämarthros und damit die Möglichkeit einer Aussage über den Nutzen von PRP zur Wachstumsfaktoraugmentation und Entzündungsmediation ein. In dieser Studie wurde der zeitliche Verlauf der Konzentrationsverhältnisse im postoperativen Gelenk nicht untersucht. Es wäre nötig, zu wiederholten Zeitpunkten den Gelenkerguss und die Synovialflüssigkeit zu analysieren. So ist für TGF- β in vitro beschrieben, dass es erst im Laufe der Regenerationsphase der Wundheilung in der Lage ist, den Knorpelmatrixabbau durch IL-1 zu antagonisieren und die Wiederauffüllung der Knorpelmatrix durch Proteoglykansynthese zu stimulieren (van Beuningen et al., 1998).

Die Bedeutung des zeitlichen Verlaufes der Wirkung von PRP und seinen Wachstumsfaktoren auf die chondrale Regeneration zeigte sich im Kleinterversuch, wo PRP zusammen mit MSCs gegenüber reiner PRP- oder MSC-Gabe nach vier Wochen signifikant bessere histologische Scores erreichte und die Bildung von hyalinartigem Knorpel darstellbar war. Nach zwölf Wochen konnte in der PRP-Gruppe keine weitere Verbesserung des Scores bei weiterhin bestehender Überlegenheit der histologischen Scores gegenüber den Gruppen mit alleiniger PRP- oder MSC-Gabe erreicht werden. Dieser Wirkungsverlust nach zwölf Wochen galt auch für die Reduktion der Chondrozytenapoptose (Mifune et al., 2013). Insgesamt spricht dies für eine positive Beeinflussung der initialen Phase der Knorpelregeneration durch PRP. Auch die Addition von BMP-4 und die Antagonisierung von VEGF zusätzlich zur PRP-Gabe wurde in derselben Arbeit untersucht. Beide führten noch zu weiterer makroskopischer und mikroskopischer Verbesserung des Knorpelregenerates. Hier bestätigte sich die chondrogene Potenz von BMP-4, das, wie unsere Messungen zeigen, über PRP in überphysiologischer Konzentration zugeführt wird.

Diese Erkenntnisse unterstützen die These, dass trotz in unseren Messungen signifikant erhöhter Werte für das knorpelkatabole TNF- α eine adjuvante Wirkung auf die Knorpelregeneration durch die Summe der Wachstumsfaktoren und ihrer Wechselwirkungen im PRP zu erwarten ist. Dies scheint vor allem in der Augmentation der anabolen Wachstumsfaktoren im PRP, inklusive der in unseren Messungen signifikant erhöhten BMP-4 und TGF- β -Konzentrationen, möglicherweise aber auch in den in anderen Arbeiten als knorpelanabol beschriebenen Faktoren wie zum Beispiel PDGF, IGF oder HGF begründet zu sein.

In der Zusammenschau mit den Ergebnissen vorangegangener Studien zur Evaluation von PRP

als chondroregenerativem Adjuvans legen unsere Messungen nahe, dass nicht nur die absolute Konzentration einzelner Wachstumsfaktoren und inflammatorischer Marker, sondern auch das wiederholt gezeigte Gefüge aus modulatorischen, regulatorischen und inhibitorischen Faktoren und deren Signalkaskaden zu berücksichtigen ist. Diese Wechselwirkungen scheinen in mehreren Studien den Stellenwert der Konzentrationen einzelner Faktoren mit charakteristischer Wirkung zu relativieren oder sogar zu überwiegen.

In dieser Studie haben wir auf die bisherigen Erkenntnisse aus der Erforschung der Rolle von Zytokinen und Wachstumsfaktoren und deren bisher beschriebenen Eigenschaften und Wirkungsmechanismen auf die Regeneration von Gelenkknorpel Bezug genommen. Daraus leiteten wir ab, dass eine Aussage über die chondrogene und chondroregenerative Potenz von PRP und Hämarthros auf dem Boden der gemessenen Faktoren IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β , VEGF und BMP-4 zu treffen ist. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Informationen über die Wirkungen auf das osteoarthrotische Gelenk aus den verschiedensten Studiendesigns kommen. Die Daten, die zum derzeitigen Kenntnisstand über die Funktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen bei Osteoarthritis führen, stammen aus in vitro-Experimenten wie Zellkulturen, Kleinterversuchen verschiedener Spezies, Großtierversuchen und klinischen Studien mit konservativem sowie chirurgischem Therapieansatz. Letztgenannte waren oft nur Ergebnisse sehr kleiner Fallzahlen.

Auch die Modelle zur Osteoarthritisinduktion waren unterschiedlich. Teils wurde im Tierversuch eine mechanisch induzierte Arthritis, zum Beispiel durch Kreuzbanddurchtrennung hervorgerufen, teils ein osteochondraler Defekt gesetzt und teils chemisch intraartikulär ein arthrotisches Geschehen induziert. In Untersuchungen der Zellkultur unterschieden sich die proinflammatorischen Faktoren, mit denen ein arthrotisches Milieu für die Chondrozyten simuliert wurde. Es gibt jedoch unserem Kenntnisstand nach keine valide Aussage über die Vergleichbarkeit der verschiedenen Verfahren und im Falle von Tiermodellen, die Reproduzierbarkeit der Verhältnisse im humanen osteoarthrotischen Kniegelenk bei artifiziell induzierter Arthritis. Gerade unter dem Aspekt der Osteoarthritis als Erkrankung des gesamten Gelenkes ist zu hinterfragen, ob zum Beispiel mechanisch provozierte Gelenkknorpeldefekte im Modell auch zu einer entzündlichen Beteiligung der restlichen Gelenkkomponenten geführt haben, da das biochemische Milieu beispielsweise durch eine synoviale Begleitreaktion maßgeblich beeinflusst wird. Auch die Tiefe des Defektes bzw. die Frage einer Knochenbeteiligung oder gar Knochenmarkseröffnung ergibt andere Ausgangsvoraussetzungen für die Entzündungs- aber auch Wundheilungsprozesse im Gelenk, insbesondere im Hinblick auf die untersuchte BMP-4-Konzentration.

Im Hinblick auf die intrinsische chondrogene Potenz von Hämarthros und deren klinische

Bedeutung besteht ein Nachteil darin, dass das Hämarthros in seiner originären Zusammensetzung kaum reproduzierbar ist, da es bereits über aktivierte, im Entzündungs- und Heilungsprozess involvierte Thrombozyten verfügt. Darüber hinaus wird das Hämarthros postoperativ entweder drainiert oder resorbiert und steht so nach kurzer Zeit nicht mehr als Quelle von Wachstumsfaktoren zur Verfügung. Wenn die chondrogene Potenz der Wachstumsfaktoren des nativen Hämarthros therapeutisch eingesetzt werden sollte, müsste es unmittelbar und antikoaguliert abpunktiert werden, um für mögliche spätere Nutzung zur Aufrechterhaltung eines proregenerativen Milieus im Gelenk konserviert zu werden. PRP wäre in diesem Zusammenhang leichter reproduzierbar - keine nennenswerten Blutbildveränderungen vorausgesetzt - und könnte stets aus periphervenösem Blut zur Aufrechterhaltung der chondrogenen Effekte auf das arthrotische Gelenk reproduziert und injiziert werden.

Bei dem Vergleich der in dieser Arbeit analysierten Wachstumsfaktoren zwischen Hämarthros und Serum ergaben sich ausnahmslos verschiedene Konzentrationen, obwohl Hämarthros formell ein Serum ist, was zentrifugiert wurde. Auch hier muss die Herkunft aus verschiedenem Probenmaterial (Hämarthros vom Osteoarthritis-Patient nach AAP vs. Serum eines gesunden Probanden) berücksichtigt werden. Die Unterschiede in den von uns gemessenen Konzentrationen im Hämarthros und venösen Serum sind wohl dadurch zu erklären, dass sich Hämarthros aus Hämatom und Synovialflüssigkeit zusammensetzt und damit auch Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren, die von verschiedenen Zelltypen wie Synovialozyten, Fibrozyten, Leukozyten und Epithelzellen aus dem eröffneten Markraum ausgeschüttet werden, enthält bzw. deren Wechselwirkungen bereits unterlegen ist. Im Hämarthros spielen die bereits erfolgten Aktivierungsvorgänge der Thrombozyten im Rahmen der inflammatorischen Phase der Wundheilung eine Rolle, die bei der Serumgewinnung aus periphervenösem Blut gesunder Patienten nicht zu erwarten ist.

Generell besteht ein großer Nachteil der bisherigen Arbeiten über den Einsatz von PRP bei Gelenkerkrankungen darin, dass kaum objektive Ergebnisse von Langzeitstudien mit regelmäßigen Nachuntersuchungen existieren. Gerade unter dem Aspekt des mehrfach beschriebenen Wirkverlustes von PRP, aber auch im Hinblick auf das mögliche knorpelkatabole und proinflammatorische Potenzial wäre eine längerfristige Reevaluation des Gelenkstatus nötig. Dabei entsteht das Problem, dass Scores, die bisher in den meisten follow-up-Studien die Funktionalität und subjektiv empfundene Einschränkung des Gelenkes werten, keine Aussage über die Beschaffenheit der beteiligten Gelenkstrukturen treffen. Hierüber müssten invasive Untersuchungen wie Arthroscopien mit Probenentnahme und histologischer Aufarbeitung Auskunft geben, was aufgrund der in vielen Fällen fehlenden Indikation sowie den operationsassoziierten Risiken nur schwer für randomisierte Studien umsetzbar wäre.

Alternativ könnte eine Darstellung der Gelenkstrukturen durch Magnetresonanztomographie erfolgen, was aufgrund eingeschränkter Ressourcen nur bedingt umsetzbar wäre und darüber hinaus keine Aussage über die histologische Knorpelqualität zuließe.

Es ist darüber hinaus von Bedeutung, die Korrelation der Wachstumsfaktoren und Zytokine im Gelenkspalt mit dem Erkrankungsgrad des Gelenkes weiter zu untersuchen, um zum Beispiel durch Analyse von Synoviaaspirat valide Verlaufsp Parameter zur Beurteilung von destruktiven und regenerativen Prozessen im arthrotischen Gelenk zu finden.

Bezüglich des Zeitpunktes einer PRP-Injektion stellt sich die Frage nach dem Nutzen einer initialen, z.B. perioperativen Injektion. Zum einen muss das frisch operierte Gelenk aufgrund des entstehenden Hämarthros drainiert werden, was zu einer umgehenden Entfernung des PRP aus dem Gelenk führt. Zum anderen ist das Volumenverhältnis zu beachten. So ist die Wahrscheinlichkeit einer signifikanten Augmentation der knorpelanabolen Wachstumsfaktoren durch Injektion von einigen Millilitern PRP im Gelenkspalt aufgrund der Verdünnung durch das eher im dreistelligen Milliliter-Bereich entstehende Hämarthros direkt nach der Operation wenig erfolgversprechend. Vielmehr sollte in Betracht gezogen werden, mit PRP ein knorpelanaboles Milieu nach Abbau und Drainage des Hämarthros aufrechtzuerhalten.

Bei der Beurteilung einer Behandlung von arthrotischen Defekten mit PRP und der Frage nach ihrer Berechtigung bzw. ihrem signifikanten Nutzen bleibt immer wieder die Forderung nach prospektiven Beurteilungen der placebokontrollierten Anwendung in suffizientem Studiendesign. Ein Vorteil des PRP besteht darin, dass bisher keine klinisch relevanten Nachteile aus einer Behandlung beschrieben wurden und kaum zu erwarten sind. Es gibt kaum ethische Bedenken für eine groß angelegte randomisierte prospektive Studie, da selbst die Behandlung mit PRP keinerlei kurativen Ansatz der Grunderkrankung zu versprechen scheint. Umgekehrt gibt es empirische wie biochemische Grundlagen für einen proinflammatorischen Effekt und klinischen Nachteil des physiologischen Hämarthros nach Operation. Insbesondere der chronische Charakter der Osteoarthrose und das ätiologische Profil sollten bei klinischen Studien berücksichtigt werden, da sich in der Gesamtheit der Osteoarthrosepatienten viele verschiedene Phänotypen verbergen, die entsprechend unterschiedliche Regenerationspotenziale aufweisen – von der Arthrose im Senium über Folgen konnataler Bewegungsapparatinkongruenzen bis zu traumatisch bedingten Degenerationerscheinungen allen Alters.

Perspektive für zukünftige Behandlungen bietet auch die Kombination von PRP, sowohl mit Stammzellen wie MSCs (z.B. eingebracht in Form eines zweischichtigen Scaffolds) als auch mit selektiven Antagonisten proarthrotischer, knorpelkataboler oder proinflammatorischer Zytokine.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass im PRP gegenüber dem Blutplasma aber auch gegenüber dem HämARTHROS signifikant höhere Konzentrationen an TGF- β sowie BMP-4 vorlagen. Dabei handelt es sich um Proteine, die im Rahmen der Chondroneogenese und Knorpelregeneration knorpelanabol wirken. Gegenüber dem Blutplasma zeigten sich darüber hinaus signifikant höhere Werte für VEGF als essentiellen Faktor der Angiogeneese mit proinflammatorischen, aber auch für jede Gewebeheilung essenziellen Eigenschaften. Es wäre somit möglich durch intraartikuläre PRP-Injektion eine Augmentation knorpelanaboler Wachstumsfaktoren im Gelenk zu erreichen. In vorangegangenen Studien konnte die Bedeutung des gesamten Wachstumsfaktorgefüges gegenüber den Funktionen einzelner Wachstumsfaktoren im PRP gezeigt werden, so dass die ebenfalls signifikant erhöhte Konzentration von TNF- α als proinflammatorischem Faktor re-lativiert wird und nicht prinzipiell einer insgesamt knorpelanabolen Funktion von PRP widerspricht, zumal sich schon im physiologischen Serum höhere Konzentrationen als im PRP fanden. Die Ergebnisse unterstützen die Hinweise einer chondrogenen Potenz von PRP auch im Vergleich zum HämARTHROS. Die adjuvante Gabe von PRP intraartikulär könnte sich so positiv auf die Knorpelregeneration nach AAP auswirken. Aufgrund der autologen Herkunft sind keine signifikanten Nebenwirkungen des PRP zu erwarten. Die Frage nach der Dosis ist ebenso wie der optimale Zeitpunkt der Injektion in prospektiven klinischen Studien zu klären. Darüber hinaus gilt es zu klären, ob wiederholte Gaben von PRP und die Aufrechterhaltung eines knorpelanabolen Mikromilieus über längere Zeit zu einer positiven Beeinflussung der Chondroregeneration beitragen. Insgesamt scheint PRP die Möglichkeit der Augmentation der natürlich im HämARTHROS vorkommenden knorpelanabolen Wachstumsfaktoren ohne signifikante Erhöhung proinflammatorischer Zytokine und unter Vermeidung der proinflammatorischen Wirkung von Erythrozyten und Leukozyten im HämARTHROS zu bieten.

6. Literaturverzeichnis

- Abraham, L.J., Kroeger, K.M., 1999. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J. Leukoc. Biol.* 66, 562–566.
- Altman, R.D., 2010. New guidelines for topical NSAIDs in the osteoarthritis treatment paradigm. *Curr Med Res Opin* 26, 2871–2876. doi:10.1185/03007995.2010.533650
- Baer, P.A., Thomas, L.M., Shainhouse, Z., 2005. Treatment of osteoarthritis of the knee with a topical diclofenac solution: a randomised controlled, 6-week trial [ISRCTN53366886]. *BMC Musculoskelet Disord* 6, 44. doi:10.1186/1471-2474-6-44
- Balding, J., Kane, D., Livingstone, W., Mynett-Johnson, L., Bresnihan, B., Smith, O., FitzGerald, O., 2003. Cytokine gene polymorphisms: association with psoriatic arthritis susceptibility and severity. *Arthritis Rheum.* 48, 1408–1413. doi:10.1002/art.10935
- Barkin, R.L., Beckerman, M., Blum, S.L., Clark, F.M., Koh, E.-K., Wu, D.S., 2010. Should nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) be prescribed to the older adult? *Drugs Aging* 27, 775–789. doi:10.2165/11539430-000000000-00000
- Bendinelli, P., Matteucci, E., Dogliotti, G., Corsi, M.M., Banfi, G., Maroni, P., Desiderio, M.A., 2010. Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF- κ B inhibition via HGF. *J. Cell. Physiol.* 225, 757–766. doi:10.1002/jcp.22274
- Bennett, S.P., Griffiths, G.D., Schor, A.M., Leese, G.P., Schor, S.L., 2003. Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. *Br J Surg* 90, 133–146. doi:10.1002/bjs.4019
- Bert, J.M., Maschka, K., 1989. The arthroscopic treatment of unicompartmental gonarthrosis: a five-year follow-up study of abrasion arthroplasty plus arthroscopic debridement and arthroscopic debridement alone. *Arthroscopy* 5, 25–32.
- Beutler, B.A., Cerami, A., 1985. Recombinant interleukin 1 suppresses lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 cells. *J. Immunol.* 135, 3969–3971.
- Blagojevic, M., Jinks, C., Jeffery, A., Jordan, K.P., 2010. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthr. Cartil.* 18, 24–33. doi:10.1016/j.joca.2009.08.010

- Boswell, S.G., Cole, B.J., Sundman, E.A., Karas, V., Fortier, L.A., 2012. Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy* 28, 429–439. doi:10.1016/j.arthro.2011.10.018
- Bramlage, C.P., Häupl, T., Kaps, C., Ungethüm, U., Krenn, V., Pruss, A., Müller, G.A., Strutz, F., Burmester, G.-R., 2006. Decrease in expression of bone morphogenetic proteins 4 and 5 in synovial tissue of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 8, R58. doi:10.1186/ar1923
- Broderick, E., Infanger, S., Turner, T.M., Sumner, D.R., 2005. Depressed Bone Mineralization Following High Dose TGF- β 1 Application in an Orthopedic Implant Model. *Calcified Tissue International* 76, 379–384. doi:10.1007/s00223-004-0150-9
- Cerza, F., Carnì, S., Carcangiu, A., Di Vavo, I., Schiavilla, V., Pecora, A., De Biasi, G., Ciuffreda, M., 2012. Comparison between hyaluronic acid and platelet-rich plasma, intra-articular infiltration in the treatment of gonarthrosis. *Am J Sports Med* 40, 2822–2827. doi:10.1177/0363546512461902
- Cohen, S.B., Proudman, S., Kivitz, A.J., Burch, F.X., Donohue, J.P., Burstein, D., Sun, Y.-N., Banfield, C., Vincent, M.S., Ni, L., Zack, D.J., 2011. A randomized, double-blind study of AMG 108 (a fully human monoclonal antibody to IL-1R1) in patients with osteoarthritis of the knee. *Arthritis Res. Ther.* 13, R125. doi:10.1186/ar3430
- Crawford, D.C., Miller, L.E., Block, J.E., 2013. Conservative management of symptomatic knee osteoarthritis: a flawed strategy? *Orthop Rev (Pavia)* 5, e2. doi:10.4081/or.2013.e2
- de Hooge, A.S.K., van de Loo, F.A.J., Bennink, M.B., Arntz, O.J., de Hooge, P., van den Berg, W.B., 2005. Male IL-6 gene knock out mice developed more advanced osteoarthritis upon aging. *Osteoarthr. Cartil.* 13, 66–73. doi:10.1016/j.joca.2004.09.011
- Derfoul, A., Perkins, G.L., Hall, D.J., Tuan, R.S., 2006. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells* 24, 1487–1495. doi:10.1634/stemcells.2005-0415
- Dvorak, H.F., 2006. Discovery of vascular permeability factor (VPF). *Exp. Cell Res.* 312, 522–526. doi:10.1016/j.yexcr.2005.11.026
- Eppley, B.L., Woodell, J.E., Higgins, J., 2004. Platelet quantification and growth fac-

- tor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 114, 1502–1508.
- Evans, C.H., Mazzocchi, R.A., Nelson, D.D., Rubash, H.E., 1984. Experimental arthritis induced by intraarticular injection of allogenic cartilaginous particles into rabbit knees. *Arthritis Rheum.* 27, 200–207.
- Everts, P.A.M., Knape, J.T.A., Weibrich, G., Schönberger, J.P.A.M., Hoffmann, J., Overdevest, E.P., Box, H.A.M., van Zundert, A., 2006. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol* 38, 174–187.
- Fan, Z., Bau, B., Yang, H., Aigner, T., 2004. IL-1 β induction of IL-6 and LIF in normal articular human chondrocytes involves the ERK, p38 and NF κ B signaling pathways. *Cytokine* 28, 17–24. doi:10.1016/j.cyto.2004.06.003
- Felson, D.T., Lawrence, R.C., Dieppe, P.A., Hirsch, R., Helmick, C.G., Jordan, J.M., Kington, R.S., Lane, N.E., Nevitt, M.C., Zhang, Y., Sowers, M., McAlindon, T., Spector, T.D., Poole, A.R., Yanovski, S.Z., Ateshian, G., Sharma, L., Buckwalter, J.A., Brandt, K.D., Fries, J.F., 2000. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann. Intern. Med.* 133, 635–646.
- Fernandes, J.C., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.-P., 2002. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 39, 237–246.
- Flannery, C.R., Little, C.B., Hughes, C.E., Curtis, C.L., Caterson, B., Jones, S.A., 2000. IL-6 and its soluble receptor augment aggrecanase-mediated proteoglycan catabolism in articular cartilage. *Matrix Biol.* 19, 549–553.
- Foster, T.E., Puskas, B.L., Mandelbaum, B.R., Gerhardt, M.B., Rodeo, S.A., 2009. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med* 37, 2259–2272. doi:10.1177/0363546509349921
- Friedman, M.J., Berasi, C.C., Fox, J.M., Del Pizzo, W., Snyder, S.J., Ferkel, R.D., 1984. Preliminary results with abrasion arthroplasty in the osteoarthritic knee. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 200–205.
- Gammaitoni, A.R., Galer, B.S., Onawola, R., Jensen, M.P., Argoff, C.E., 2004. Lidocaine patch 5% and its positive impact on pain qualities in osteoarthritis: results of a pilot 2-week, open-label study using the Neuropathic Pain Scale. *Curr Med Res Opin* 20 Suppl 2, S13–19. doi:10.1185/030079904X12951
- Gandhi, A., Dumas, C., Dumas, C., O'Connor, J.P., Parsons, J.R., Lin, S.S., 2006. The

- effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone* 38, 540–546. doi:10.1016/j.bone.2005.10.019
- Goldring, M.B., 2012. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 4, 269–285. doi:10.1177/1759720X12448454
- Goldring, M.B., Marcu, K.B., 2012. Epigenomic and microRNA-mediated regulation in cartilage development, homeostasis, and osteoarthritis. *Trends Mol Med* 18, 109–118. doi:10.1016/j.molmed.2011.11.005
- Guerne, P.A., Desgeorges, A., Jaspard, J.M., Relic, B., Peter, R., Hoffmeyer, P., Dayer, J.M., 1999. Effects of IL-6 and its soluble receptor on proteoglycan synthesis and NO release by human articular chondrocytes: comparison with IL-1. Modulation by dexamethasone. *Matrix Biol.* 18, 253–260.
- Halpern, B.C., Chaudhury, S., Rodeo, S.A., 2012. The Role of Platelet-Rich Plasma in Inducing Musculoskeletal Tissue Healing. *HSS Journal* ® 8, 137–145. doi:10.1007/s11420-011-9239-7
- Hapa, O., 2013. Does platelet-rich plasma enhance microfracture treatment for chronic focal chondral defects? An in-vivo study performed in a rat model. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica* 47, 201–207. doi:10.3944/AOTT.2013.2928
- Harrison, S., Vavken, P., Kevy, S., Jacobson, M., Zurakowski, D., Murray, M.M., 2011. Platelet activation by collagen provides sustained release of anabolic cytokines. *Am J Sports Med* 39, 729–734. doi:10.1177/0363546511401576
- Hartz, C., 2012. Molekulare Analyse des Hämarthros nach Kniegelenkarthroskopie. Med. Diss. Kiel.
- Hashizume, M., Mihara, M., 2009. Desirable effect of combination therapy with high molecular weight hyaluronate and NSAIDs on MMP production. *Osteoarthr. Cartil.* 17, 1513–1518. doi:10.1016/j.joca.2009.04.018
- Jang, S.-J., Kim, J.-D., Cha, S.-S., 2013. Platelet-rich plasma (PRP) injections as an effective treatment for early osteoarthritis. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 23, 573–580. doi:10.1007/s00590-012-1037-5
- Johnson, L.L., 2001. Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. *Clin. Orthop. Relat. Res.* S306–317.
- Johnson, L.L., 1986. Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic per-

- spective: present status. *Arthroscopy* 2, 54–69.
- Kaps, C., Bramlage, C., Smolian, H., Haisch, A., Ungethüm, U., Burmester, G.-R., Sittinger, M., Gross, G., Häupl, T., 2002. Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction. *Arthritis Rheum.* 46, 149–162. doi:10.1002/1529-0131(200201)46:1<149::AID-ART10058>3.0.CO;2-W
- Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslaris, E., Kioussis, D., Kollias, G., 1991. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* 10, 4025–4031.
- Kim, H.K., Moran, M.E., Salter, R.B., 1991. The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 73, 1301–1315.
- Kim, I., Kim, H.A., Seo, Y.-I., Song, Y.W., Jeong, J.-Y., Kim, D.H., 2010. The prevalence of knee osteoarthritis in elderly community residents in Korea. *J. Korean Med. Sci.* 25, 293–298. doi:10.3346/jkms.2010.25.2.293
- Klagsbrun, M., Takashima, S., Mamluk, R., 2002. The role of neuropilin in vascular and tumor biology. *Adv. Exp. Med. Biol.* 515, 33–48.
- Klatt, A.R., Paul-Klausch, B., Klinger, G., Kühn, G., Renno, J.H., Banerjee, M., Malchau, G., Wielckens, K., 2009. A critical role for collagen II in cartilage matrix degradation: collagen II induces pro-inflammatory cytokines and MMPs in primary human chondrocytes. *J. Orthop. Res.* 27, 65–70. doi:10.1002/jor.20716
- Koch, A.E., Harlow, L.A., Haines, G.K., Amento, E.P., Unemori, E.N., Wong, W.L., Pope, R.M., Ferrara, N., 1994. Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 152, 4149–4156.
- Kokkonen, H., Söderström, I., Rocklöv, J., Hallmans, G., Lejon, K., Rantapää Dahlqvist, S., 2010. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 62, 383–391. doi:10.1002/art.27186
- Kon, E., Filardo, G., Matteo, B.D., Marcacci, M., 2013. PRP For the Treatment of Cartilage Pathology. *Open Orthop J* 7, 120–128. doi:10.2174/1874325001307010120
- Kosuwon, W., Sirichatiwapee, W., Wisanuyotin, T., Jeeravipoolvarn, P., Laupattarakasem, W., 2010. Efficacy of symptomatic control of knee osteoarthritis with 0.0125% of capsaicin versus placebo. *J Med Assoc Thai* 93, 1188–1195.

- Kraan, P.M., Goumans, M.-J., Blaney Davidson, E., Dijke, P., 2011. Age-dependent alteration of TGF- β signalling in osteoarthritis. *Cell and Tissue Research* 347, 257–265. doi:10.1007/s00441-011-1194-6
- Kurth, T., Hedbom, E., Shintani, N., Sugimoto, M., Chen, F.H., Haspl, M., Martinovic, S., Hunziker, E.B., 2007. Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate. *Osteoarthr. Cartil.* 15, 1178–1189. doi:10.1016/j.joca.2007.03.015
- Kwon, D.R., Park, G.Y., Lee, S.-U., 2012. The effects of intra-articular platelet-rich plasma injection according to the severity of collagenase-induced knee osteoarthritis in a rabbit model. *Ann Rehabil Med* 36, 458–465. doi:10.5535/arm.2012.36.4.458
- Lange, C., 2012. Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie “Gesundheit in Deutschland aktuell 2010.” Robert-Koch-Inst., Berlin.
- Lee, G.W., Son, J.-H., Kim, J.-D., Jung, G.-H., 2013. Is platelet-rich plasma able to enhance the results of arthroscopic microfracture in early osteoarthritis and cartilage lesion over 40 years of age? *Eur J Orthop Surg Traumatol* 23, 581–587. doi:10.1007/s00590-012-1038-4
- Lefebvre, V., Peeters-Joris, C., Vaes, G., 1990. Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1052, 366–378.
- Legendre, F., Dudhia, J., Pujol, J.-P., Bogdanowicz, P., 2003. JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of Type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. Association with a down-regulation of SOX9 expression. *J. Biol. Chem.* 278, 2903–2912. doi:10.1074/jbc.M110773200
- Li, N., Hu, H., Lindqvist, M., Wikström-Jonsson, E., Goodall, A.H., Hjemdahl, P., 2000. Platelet-leukocyte cross talk in whole blood. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2702–2708.
- Lippross, S., Moeller, B., Haas, H., Tohidnezhad, M., Steubesand, N., Wruck, C.J., Kurz, B., Seekamp, A., Pufe, T., Varoga, D., 2011. Intraarticular injection of platelet-rich plasma reduces inflammation in a pig model of rheumatoid arthritis of the knee joint. *Arthritis & Rheumatism* 63, 3344–3353. doi:10.1002/art.30547
- Liu, Y., Kalén, A., Risto, O., Wahlström, O., 2002. Fibroblast proliferation due to expo-

- sure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair Regen* 10, 336–340.
- Livshits, G., Zhai, G., Hart, D.J., Kato, B.S., Wang, H., Williams, F.M.K., Spector, T.D., 2009. Interleukin-6 is a significant predictor of radiographic knee osteoarthritis: The Chingford study. *Arthritis & Rheumatism* 60, 2037–2045. doi:10.1002/art.24598
- Lories, R.J.U., Derese, I., Luyten, F.P., 2005. Modulation of bone morphogenetic protein signaling inhibits the onset and progression of ankylosing enthesitis. *J. Clin. Invest.* 115, 1571–1579. doi:10.1172/JCI23738
- Lucerna, M., Zerneck, A., de Nooijer, R., de Jager, S.C., Bot, I., van der Lans, C., Kholova, I., Liehn, E.A., van Berkel, T.J.C., Yla-Herttuala, S., Weber, C., Biessen, E.A.L., 2007. Vascular endothelial growth factor-A induces plaque expansion in ApoE knock-out mice by promoting de novo leukocyte recruitment. *Blood* 109, 122–129. doi:10.1182/blood-2006-07-031773
- Ludin, A., Sela, J.J., Schroeder, A., Samuni, Y., Nitzan, D.W., Amir, G., 2013. Injection of vascular endothelial growth factor into knee joints induces osteoarthritis in mice. *Osteoarthr. Cartil.* 21, 491–497. doi:10.1016/j.joca.2012.12.003
- Lüllmann-Rauch, R., 2003. *Histologie: Verstehen, Lernen, Nachschlagen ; 10 Tabellen.* Thieme, Stuttgart [u.a.].
- Marx, R.E., 2001. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 10, 225–228.
- Marx, R.E., Carlson, E.R., Eichstaedt, R.M., Schimmele, S.R., Strauss, J.E., Georgeff, K.R., 1998a. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85, 638–646.
- Marx, R.E., Carlson, E.R., Eichstaedt, R.M., Schimmele, S.R., Strauss, J.E., Georgeff, K.R., 1998b. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85, 638–646.
- Matsumoto, T., Cooper, G.M., Gharaibeh, B., Meszaros, L.B., Li, G., Usas, A., Fu, F.H., Huard, J., 2009. Cartilage repair in a rat model of osteoarthritis through intra-articular transplantation of muscle-derived stem cells expressing bone morphogenetic protein 4 and soluble Flt-1. *Arthritis Rheum.* 60, 1390–1405. doi:10.1002/art.24443

- McCarrel, T., Fortier, L., 2009. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J. Orthop. Res.* 27, 1033–1042. doi:10.1002/jor.20853
- Mehta, S., Watson, J.T., 2008. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma* 22, 432–438. doi:10.1097/BOT.0b013e31817e793f
- Mifune, Y., Matsumoto, T., Takayama, K., Ota, S., Li, H., Meszaros, L.B., Usas, A., Nagamune, K., Gharaibeh, B., Fu, F.H., Huard, J., 2013. The effect of platelet-rich plasma on the regenerative therapy of muscle derived stem cells for articular cartilage repair. *Osteoarthr. Cartil.* 21, 175–185. doi:10.1016/j.joca.2012.09.018
- Milano, G., Sanna Passino, E., Deriu, L., Careddu, G., Manunta, L., Manunta, A., Saccomanno, M.F., Fabbriciani, C., 2010. The effect of platelet rich plasma combined with microfractures on the treatment of chondral defects: an experimental study in a sheep model. *Osteoarthr. Cartil.* 18, 971–980. doi:10.1016/j.joca.2010.03.013
- Min, J.-K., Lee, Y.-M., Kim, J.H., Kim, Y.-M., Kim, S.W., Lee, S.-Y., Gho, Y.S., Oh, G.T., Kwon, Y.-G., 2005. Hepatocyte growth factor suppresses vascular endothelial growth factor-induced expression of endothelial ICAM-1 and VCAM-1 by inhibiting the nuclear factor-kappaB pathway. *Circ. Res.* 96, 300–307. doi:10.1161/01.RES.0000155330.07887.EE
- Mishra, A., Pavelko, T., 2006a. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med* 34, 1774–1778. doi:10.1177/0363546506288850
- Mishra, A., Pavelko, T., 2006b. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med* 34, 1774–1778. doi:10.1177/0363546506288850
- Mitchell, N., Shepard, N., 1976. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J Bone Joint Surg Am* 58, 230–233.
- Möhle, R., Green, D., Moore, M.A., Nachman, R.L., Rafii, S., 1997. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 663–668.
- Nakase, T., Miyaji, T., Tomita, T., Kaneko, M., Kuriyama, K., Myoui, A., Sugamoto, K., Ochi, T., Yoshikawa, H., 2003. Localization of bone morphogenetic protein-2 in human osteoarthritic cartilage and osteophyte. *Osteoarthr. Cartil.* 11, 278–284.

- Namba, A., Aida, Y., Suzuki, N., Watanabe, Y., Kawato, T., Motohashi, M., Maeno, M., Matsumura, H., Matsumoto, M., 2007. Effects of IL-6 and soluble IL-6 receptor on the expression of cartilage matrix proteins in human chondrocytes. *Connect. Tissue Res.* 48, 263–270. doi:10.1080/03008200701587513
- Nöthen, M., 2009. Krankheitskosten. Robert-Koch-Inst., Berlin.
- Nurden, A.T., 2011. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.* 105 Suppl 1, S13–33. doi:10.1160/THS10-11-0720
- O'Shaughnessey, K.M., Panitch, A., Woodell-May, J.E., 2011. Blood-derived anti-inflammatory protein solution blocks the effect of IL-1 β on human macrophages in vitro. *Inflamm. Res.* 60, 929–936. doi:10.1007/s00011-011-0353-2
- Partanen, T.A., Arola, J., Saaristo, A., Jussila, L., Ora, A., Miettinen, M., Stacker, S.A., Achen, M.G., Alitalo, K., 2000. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J.* 14, 2087–2096. doi:10.1096/fj.99-1049com
- Patel, S., Dhillon, M.S., Aggarwal, S., Marwaha, N., Jain, A., 2013. Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: a prospective, double-blind, randomized trial. *Am J Sports Med* 41, 356–364. doi:10.1177/0363546512471299
- Paul, C., 2004. The Burden of Musculoskeletal Conditions at the Start of the New Millennium. Report of a WHO Scientific Group. Geneva: WHO Technical Report Series, 919, 2003, pp. 218. ISBN: 92-4-120919-4. *International Journal of Epidemiology* 34, 228–229. doi:10.1093/ije/dyh383
- Pelletier, J.P., McCollum, R., Cloutier, J.M., Martel-Pelletier, J., 1995. Synthesis of metalloproteases and interleukin 6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an IL-1 mediated process. *J Rheumatol Suppl* 43, 109–114.
- Pereira, R.C., Scaranari, M., Benelli, R., Strada, P., Reis, R.L., Cancedda, R., Gentili, C., 2013. Dual effect of platelet lysate on human articular cartilage: a maintenance of chondrogenic potential and a transient proinflammatory activity followed by an inflammation resolution. *Tissue Eng Part A* 19, 1476–1488. doi:10.1089/ten.TEA.2012.0225
- Pietrzak, W.S., Eppley, B.L., 2005. Platelet rich plasma: biology and new technology. *J Craniofac Surg* 16, 1043–1054.

- Pociot, F., Mølviq, J., Wogensén, L., Worsaae, H., Dalbøge, H., Baek, L., Nerup, J., 1991. A tumour necrosis factor beta gene polymorphism in relation to monokine secretion and insulin-dependent diabetes mellitus. *Scand. J. Immunol.* 33, 37–49.
- Pohlers, D., Siegling, A., Buchner, E., Schmidt-Weber, C.B., Palombo-Kinne, E., Emmrich, F., Bräuer, R., Kinne, R.W., 2005. Expression of cytokine mRNA and protein in joints and lymphoid organs during the course of rat antigen-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 7, R445–457. doi:10.1186/ar1689
- Porée, B., Kypriotou, M., Chadjichristos, C., Beauchef, G., Renard, E., Legendre, F., Melin, M., Gueret, S., Hartmann, D.-J., Malléin-Gerin, F., Pujol, J.-P., Boumedienne, K., Galéra, P., 2008. Interleukin-6 (IL-6) and/or soluble IL-6 receptor down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes requires a decrease of Sp1.Sp3 ratio and of the binding activity of both factors to the COL2A1 promoter. *J. Biol. Chem.* 283, 4850–4865. doi:10.1074/jbc.M706387200
- Pufe, T., Petersen, W., Tillmann, B., Mentlein, R., 2001. Splice variants VEGF121 and VEGF165 of the angiogenic peptide vascular endothelial cell growth factor are expressed in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 28, 1482–1485.
- Pulai, J.I., Chen, H., Im, H.-J., Kumar, S., Hanning, C., Hegde, P.S., Loeser, R.F., 2005. NF-kappa B mediates the stimulation of cytokine and chemokine expression by human articular chondrocytes in response to fibronectin fragments. *J. Immunol.* 174, 5781–5788.
- Ranly, D.M., McMillan, J., Keller, T., Lohmann, C.H., Meunch, T., Cochran, D.L., Schwartz, Z., Boyan, B.D., 2005. Platelet-derived growth factor inhibits demineralized bone matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation. A study of immunocompromised mice. *J Bone Joint Surg Am* 87, 2052–2064. doi:10.2106/JBJS.D.02752
- Re'em, T., Witte, F., Willbold, E., Ruvinov, E., Cohen, S., 2012. Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone induced by spatially presented TGF-beta and BMP-4 in a bilayer affinity binding system. *Acta Biomater* 8, 3283–3293. doi:10.1016/j.actbio.2012.05.014
- Reid, M.C., Shengelia, R., Parker, S.J., 2012. Pharmacologic Management of Osteoarthritis-Related Pain in Older Adults: A Review Shows that Many Drug Therapies Provide Small-to-Modest Pain Relief. *HSS Journal* ® 8, 159–164. doi:10.1007/s11420-012-9273-0

- Roemer, F.W., Guermazi, A., Felson, D.T., Niu, J., Nevitt, M.C., Crema, M.D., Lynch, J.A., Lewis, C.E., Torner, J., Zhang, Y., 2011. Presence of MRI-detected joint effusion and synovitis increases the risk of cartilage loss in knees without osteoarthritis at 30-month follow-up: the MOST study. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 1804–1809. doi:10.1136/ard.2011.150243
- Rogerson, F.M., Chung, Y.M., Deutscher, M.E., Last, K., Fosang, A.J., 2010. Cytokine-induced increases in ADAMTS-4 messenger RNA expression do not lead to increased aggrecanase activity in ADAMTS-5-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 62, 3365–3373. doi:10.1002/art.27661
- Rübenhagen, R., Schüttrumpf, J.P., Stürmer, K.M., Frosch, K.-H., 2012. Interleukin-7 levels in synovial fluid increase with age and MMP-1 levels decrease with progression of osteoarthritis. *Acta Orthop* 83, 59–64. doi:10.3109/17453674.2011.645195
- Saito, M., Takahashi, K.A., Arai, Y., Inoue, A., Sakao, K., Tonomura, H., Honjo, K., Nakagawa, S., Inoue, H., Tabata, Y., Kubo, T., 2009. Intraarticular administration of platelet-rich plasma with biodegradable gelatin hydrogel microspheres prevents osteoarthritis progression in the rabbit knee. *Clin. Exp. Rheumatol.* 27, 201–207.
- Saklatvala, J., 1986. Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* 322, 547–549. doi:10.1038/322547a0
- Sampson, S., Gerhardt, M., Mandelbaum, B., 2008. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine* 1, 165–174. doi:10.1007/s12178-008-9032-5
- Sánchez-González, D.J., Méndez-Bolaina, E., Trejo-Bahena, N.I., 2012. Platelet-rich plasma peptides: key for regeneration. *Int J Pept* 2012, 532519. doi:10.1155/2012/532519
- Schaible, H.-G., von Banchet, G.S., Boettger, M.K., Bräuer, R., Gajda, M., Richter, F., Hensellek, S., Brenn, D., Natura, G., 2010. The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1193, 60–69. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05301.x
- Schalkwijk, J., Joosten, L.A., van den Berg, W.B., van de Putte, L.B., 1989. Chondrocyte nonresponsiveness to insulin-like growth factor 1 in experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 32, 894–900.

- Scharstuhl, A., Vitters, E.L., van der Kraan, P.M., van den Berg, W.B., 2003. Reduction of osteophyte formation and synovial thickening by adenoviral overexpression of transforming growth factor β /bone morphogenetic protein inhibitors during experimental osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 48, 3442–3451. doi:10.1002/art.11328
- Séguin, C.A., Bernier, S.M., 2003. TNF α suppresses link protein and type II collagen expression in chondrocytes: Role of MEK1/2 and NF-kappaB signaling pathways. *J. Cell. Physiol.* 197, 356–369. doi:10.1002/jcp.10371
- Sellam, J., Berenbaum, F., 2010. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 6, 625–635. doi:10.1038/nrrheum.2010.159
- Serra, C.I., Soler, C., Carillo, J.M., Sopena, J.J., Redondo, J.I., Cugat, R., 2013. Effect of autologous platelet-rich plasma on the repair of full-thickness articular defects in rabbits. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 21, 1730–1736. doi:10.1007/s00167-012-2141-0
- Shen, W., Li, Y., Tang, Y., Cummins, J., Huard, J., 2005. NS-398, a cyclooxygenase-2-specific inhibitor, delays skeletal muscle healing by decreasing regeneration and promoting fibrosis. *Am. J. Pathol.* 167, 1105–1117. doi:10.1016/S0002-9440(10)61199-6
- Sherman, O.H., Fox, J.M., Snyder, S.J., Del Pizzo, W., Friedman, M.J., Ferkel, R.D., Lawley, M.J., 1986. Arthroscopy--“no-problem surgery”. An analysis of complications in two thousand six hundred and forty cases. *J Bone Joint Surg Am* 68, 256–265.
- Shlopov, B.V., Gumanovskaya, M.L., Hasty, K.A., 2000. Autocrine regulation of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) during osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 195–205. doi:10.1002/1529-0131(200001)43:1<195::AID-ANR24>3.0.CO;2-G
- Siclari, A., Mascaro, G., Gentili, C., Cancedda, R., Boux, E., 2011. A Cell-free Scaffold-based Cartilage Repair Provides Improved Function Hyaline-like Repair at One year. *Clinical Orthopaedics and Related Research®* 470, 910–919. doi:10.1007/s11999-011-2107-4
- Silacci, P., Dayer, J.M., Desgeorges, A., Peter, R., Manueddu, C., Guerne, P.A., 1998. Interleukin (IL)-6 and its soluble receptor induce TIMP-1 expression in synovio-cytes and chondrocytes, and block IL-1-induced collagenolytic activity. *J. Biol. Chem.* 273, 13625–13629.

- Sindrilaru, A., Peters, T., Wieschalka, S., Baican, C., Baican, A., Peter, H., Hainzl, A., Schatz, S., Qi, Y., Schlecht, A., Weiss, J.M., Wlaschek, M., Sunderkötter, C., Scharffetter-Kochanek, K., 2011. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J. Clin. Invest.* 121, 985–997. doi:10.1172/JCI44490
- Singh, J.A., Furst, D.E., Bharat, A., Curtis, J.R., Kavanaugh, A.F., Kremer, J.M., Moreland, L.W., O'Dell, J., Winthrop, K.L., Beukelman, T., Bridges, S.L.J., Chatham, W.W., Paulus, H.E., Suarez-Almazor, M., Bombardier, C., Dougados, M., Khanna, D., King, C.M., Leong, A.L., Matteson, E.L., Schousboe, J.T., Moynihan, E., Kolba, K.S., Jain, A., Volkmann, E.R., Agrawal, H., Bae, S., Mudano, A.S., Patkar, N.M., Saag, K.G., 2012. 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 64, 625–639. doi:10.1002/acr.21641
- Smyth, N.A., Murawski, C.D., Haleem, A.M., Hannon, C.P., Savage-Elliott, I., Kennedy, J.G., 2012. Establishing proof of concept: Platelet-rich plasma and bone marrow aspirate concentrate may improve cartilage repair following surgical treatment for osteochondral lesions of the talus. *World J Orthop* 3, 101–108. doi:10.5312/wjo.v3.i7.101
- Snijders, G.F., den Broeder, A.A., van Riel, P.L.C.M., Straten, V.H.H.P., de Man, F.H.R., van den Hoogen, F.H.J., van den Ende, C.H.M., NOAC Study Group, 2011. Evidence-based tailored conservative treatment of knee and hip osteoarthritis: between knowing and doing. *Scand. J. Rheumatol.* 40, 225–231. doi:10.3109/03009742.2010.530611
- Song, R.-H., Tortorella, M.D., Malfait, A.-M., Alston, J.T., Yang, Z., Arner, E.C., Griggs, D.W., 2007. Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum.* 56, 575–585. doi:10.1002/art.22334
- Stanos, S.P., 2013. Osteoarthritis guidelines: a progressive role for topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Multidiscip Healthc* 6, 133–137. doi:10.2147/JMDH.S35229
- St. Sauver, J.L., Warner, D.O., Yawn, B.P., Jacobson, D.J., McGree, M.E., Pankratz, J.J., Melton, L.J., Roger, V.L., Ebbert, J.O., Rocca, W.A., 2013. Why Patients Visit Their Doctors: Assessing the Most Prevalent Conditions in a Defined American Population. *Mayo Clinic Proceedings* 88, 56–67. doi:10.1016/j.mayocp.2012.08.020

- Sun, Y., Feng, Y., Zhang, C.Q., Chen, S.B., Cheng, X.G., 2010. The regenerative effect of platelet-rich plasma on healing in large osteochondral defects. *Int Orthop* 34, 589–597. doi:10.1007/s00264-009-0793-2
- Tammela, T., Enholm, B., Alitalo, K., Paavonen, K., 2005. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc. Res.* 65, 550–563. doi:10.1016/j.cardiores.2004.12.002
- Tardif, G., Hum, D., Pelletier, J.-P., Boileau, C., Ranger, P., Martel-Pelletier, J., 2004. Differential gene expression and regulation of the bone morphogenetic protein antagonists follistatin and gremlin in normal and osteoarthritic human chondrocytes and synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 50, 2521–2530. doi:10.1002/art.20441
- Tsuchida, A.I., Beekhuizen, M., Rutgers, M., van Osch, G.J., Bekkers, J.E., Bot, A.G., Geurts, B., Dhert, W.J., Saris, D.B., Creemers, L.B., 2012. Interleukin-6 is elevated in synovial fluid of patients with focal cartilage defects and stimulates cartilage matrix production in an in vitro regeneration model. *Arthritis Res. Ther.* 14, R262. doi:10.1186/ar4107
- Tsumaki, N., Nakase, T., Miyaji, T., Kakiuchi, M., Kimura, T., Ochi, T., Yoshikawa, H., 2002. Bone morphogenetic protein signals are required for cartilage formation and differently regulate joint development during skeletogenesis. *J. Bone Miner. Res.* 17, 898–906. doi:10.1359/jbmr.2002.17.5.898
- van Bergen, C.J.A., Kerkhoffs, G.M.M.J., Ozdemir, M., Korstjens, C.M., Everts, V., van Ruijven, L.J., van Dijk, C.N., Blankevoort, L., 2013. Demineralized bone matrix and platelet-rich plasma do not improve healing of osteochondral defects of the talus: an experimental goat study. *Osteoarthr. Cartil.* doi:10.1016/j.joca.2013.07.014
- van Beuningen, H.M., Glansbeek, H.L., van der Kraan, P.M., van den Berg, W.B., 1998. Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthr. Cartil.* 6, 306–317. doi:10.1053/joca.1998.0129
- van Beuningen, H.M., van der Kraan, P.M., Arntz, O.J., van den Berg, W.B., 1994. In vivo protection against interleukin-1-induced articular cartilage damage by transforming growth factor-beta 1: age-related differences. *Ann. Rheum. Dis.* 53, 593–600.
- van Buul, G.M., Koevoet, W.L.M., Kops, N., Bos, P.K., Verhaar, J.A.N., Weinans, H., Bernsen, M.R., van Osch, G.J.V.M., 2011. Platelet-rich plasma releasate inhibits inflammatory processes in osteoarthritic chondrocytes. *Am J Sports Med* 39,

- van de Loo, F.A., Arntz, O.J., van Enkevort, F.H., van Lent, P.L., van den Berg, W.B., 1998. Reduced cartilage proteoglycan loss during zymosan-induced gonarthrititis in NOS2-deficient mice and in anti-interleukin-1-treated wild-type mice with unabated joint inflammation. *Arthritis Rheum.* 41, 634–646. doi:10.1002/1529-0131(199804)41:4<634::AID-ART10>3.0.CO;2-1
- van de Loo, F.A., Joosten, L.A., van Lent, P.L., Arntz, O.J., van den Berg, W.B., 1995. Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 38, 164–172.
- Venn, G., Nietfeld, J.J., Duits, A.J., Brennan, F.M., Arner, E., Covington, M., Billingham, M.E., Hardingham, T.E., 1993. Elevated synovial fluid levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor associated with early experimental canine osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 36, 819–826.
- Verrier, S., Meury, T.R., Kupcsik, L., Heini, P., Stoll, T., Alini, M., 2010. Platelet-released supernatant induces osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells: potential role of BMP-2. *Eur Cell Mater* 20, 403–414.
- Villiger, P.M., Kusari, A.B., ten Dijke, P., Lotz, M., 1993. IL-1 beta and IL-6 selectively induce transforming growth factor-beta isoforms in human articular chondrocytes. *J. Immunol.* 151, 3337–3344.
- Visser, L.C., Arnoczky, S.P., Caballero, O., Kern, A., Ratcliffe, A., Gardner, K.L., 2010. Growth factor-rich plasma increases tendon cell proliferation and matrix synthesis on a synthetic scaffold: an in vitro study. *Tissue Eng Part A* 16, 1021–1029. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0254
- von Salis-Soglio, G., 2009. S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (DGOOC) und des Berufsverbandes der Ärzte für Orthopädie (BVO) Koxarthrose.
- Wakitani, S., Yamamoto, T., 2002. Response of the donor and recipient cells in mesenchymal cell transplantation to cartilage defect. *Microsc. Res. Tech.* 58, 14–18. doi:10.1002/jemt.10111
- Wang, P., Zhu, F., Konstantopoulos, K., 2010a. Prostaglandin E2 induces interleukin-6 expression in human chondrocytes via cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappaB activation. *Am. J. Physiol., Cell Phy-*

siol. 298, C1445–1456. doi:10.1152/ajpcell.00508.2009

- Wang, P., Zhu, F., Lee, N.H., Konstantopoulos, K., 2010b. Shear-induced interleukin-6 synthesis in chondrocytes: roles of E prostanoid (EP) 2 and EP3 in cAMP/protein kinase A- and PI3-K/Akt-dependent NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* 285, 24793–24804. doi:10.1074/jbc.M110.110320
- Wang, Z., Weitzmann, M.N., Sangadala, S., Hutton, W.C., Yoon, S.T., 2013. Link protein N-terminal peptide binds to BMP type II receptor and drives matrix protein expression in rabbit intervertebral disc cells. *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.M113.451948
- Werner, S., Grose, R., 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* 83, 835–870. doi:10.1152/physrev.00031.2002
- Wu, C.-C., Chen, W.-H., Zao, B., Lai, P.-L., Lin, T.-C., Lo, H.-Y., Shieh, Y.-H., Wu, C.-H., Deng, W.-P., 2011. Regenerative potentials of platelet-rich plasma enhanced by collagen in retrieving pro-inflammatory cytokine-inhibited chondrogenesis. *Bio-materials* 32, 5847–5854. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.002
- Zehnder, J.L., Leung, L.L., 1990. Development of antibodies to thrombin and factor V with recurrent bleeding in a patient exposed to topical bovine thrombin. *Blood* 76, 2011–2016.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

AAP	Abrasionsarthroplastik
ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
ADL	activities of daily living
BMP	Bone morphogenic protein
COMP	cartilage oligomeric matrix protein
COX	Cyclooxygenase
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
EZM	Extrazellulärmatrix
GAG	Glykosaminoglykan
HGF	Hepatocyte growth factor
hMSC	human mesenchymal stem cells
ICRS	International Cartilage Repair Society
IGF	Insuline-like growth factor
IKDC	International Knee Documentation Committee
IKK	Inhibitor of NFκB-kinase
IL	Interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase
KOOS	Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score
MDSC	muscle derived stem cells
MMP	Matrix-Metalloproteasen
NFκB	nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PG	Proteoglykan

PPP	Platelet-poor-Plasma
PRP	Platelet-rich plasma
PTGS	prostaglandin-endoperoxide synthase
TGF	Transforming growth factor
TIMP	tissue inhibitors of metalloproteases
TNF	Tumornekrosefaktor
VAS	Visuelle Analogskala
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WOMAC	Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index

7.2. Verwendete Materialien und Reagenzien

ELISA / Luminex

R&D Systems, Inc., Minneapolis

PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2-7,4, 0,2 µm filtered
Wash Buffer	0,05% Tween® 20 in PBS, pH 7,2-7,4, 0,2 µm filtered R&D Systems Catalog # WA 126
Block Buffer	5% Tween 20 in PBS, pH 7.2-7.4, 0.2 µm filtered (R&D Systems Catalog # DY004)
Reagent Diluent	1.4% delipidized bovine serum, 0.05% Tween 20 in PBS, pH 7.2-7.4, 0.2 µm filtered (Reagent Diluent Concentrate 1, R&D Systems Catalog # DY997)
Substrate Solution	1:1 mixture of Color Reagent A (H ₂ O ₂) and Color Reagent B (Tetramethylbenzidine) (R&D Systems Catalog # DY999)
Stop Solution	2 N H ₂ SO ₄ (R&D Systems Catalog # DY994)
Antikörper für die quantifizierten Wachstumsfaktoren	
TGF-β	R&D System cat: DY240
BMP-4	R&D System cat.: DY314
VEGF	R&D System cap. Antikörper: MAB-293; sec. Antikörper: BAF 293; und Standard: rhVEGF 165
IL-6	PEPROTECH, cat.: 900-K19
TNF-α	PEPROTECH, cat.: 900-K25
IL-1α	R&D-System :DY200

8. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Deike Varoga bedanken für die Überlassung des Themas, Betreuung und Anregung zur Arbeit an dem Themenkomplex des platelet-rich plasma. Besonderer Dank gilt Frau Dr. med Claudia Hartz für die Zusammenarbeit im Hinblick auf die Gewinnung und Verarbeitung der Hämarthros-Proben und die Unterstützung bei jeglichen Fragen rund um diese Arbeit.

Auch Dr. med Andreas Bayer möchte ich für die tatkräftige Unterstützung im Rahmen der Arbeit zur PRP-Herstellung danken.

Insbesondere danke ich auch Frau Dr. rer. nat. Mersedeh Tohidnezhad für ihre Unterstützung bei der technischen Umsetzung der Messung der Wachstumsfaktor- und Zytokinkonzentrationen, die Gegenstand meiner Dissertation sind.

Des Weiteren möchte ich auch PD Dr. med. Sebastian Lippross für seine Anleitung und Motivation danken.

Prof. Dr. med Andreas Seekamp danke ich für die Möglichkeit an seinem Institut diese Studie durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Pufe, dem Direktor des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der RWTH Aachen gilt mein Dank für die Bereitstellung der Mittel für die Analyse der in dieser Arbeit erwähnten Wachstumsfaktoren bzw. Zytokine.

Des weiteres möchte ich mich herzlich bei Frau Katrin Lang, Frau Gabriele Nessenius und Frau Dr.rer.nat. Nadine Steubesand für die Unterstützung, Anleitung und Hilfsbereitschaft bei der Herstellung des PRP bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Frau Katharina für ihre ständige Unterstützung und Korrekturen, sowie Frau Isabel Heidekorn für ihre Hilfe bei der Umsetzung von Satz und Druck dieser Arbeit.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Pascal Simon Plümacher
Geburtsdatum, Geburtsort: 14.12.1984, Flensburg

Schulische Bildung

1990-1994 Grundschohle Harrislee
1994-2003 Altes Gymnasium Flensburg

Universitäre Ausbildung

2004-2014 Medizinstudium an der
Christian-Albechts-Universität Kiel
Zwischenzeitliche Unterbrechung des
Studiums nach Polytrauma mit bleibender
Querschnittlähmung
2010 1. Ärztliche Prüfung
2014 2. Ärztliche Prüfung

Promotion

2011-2014 Promotion an der Klinik für Unfallchirurgie, UKSH,
Campus Kiel, Direktor Prof. Dr. A. Seekamp,
unter Prof. Dr. D. Varoga zum Thema
„Chondrogene Potenz von platelet-rich plasma“

10. Veröffentlichungen

Poster

„Chondrogene Potenz von PRP (Platelet-rich-plasma) im Vergleich zum Hämarthros“
Hartz Claudia (Heidelberg), Plümacher P., Tohidnezhad Mersedeh, Pries F., Finn J.,
Varoga D.

2. Posterpreis für Biomechanik/Grundlagenforschung
der AGA - Gesellschaft für Arthroskopie und Gelenkchirurgie und der Stiftung zur
Förderung der Arthroskopie (SFA), 21. September 2013 anlässlich des 30. AGA-Kon-
gresses in Wiesbaden.